

Spektroskopische und proteinchemische Studien an tierischen und pflanzlichen Metallothioneinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
WERNER ROBERT BERNHARD
aus Winterthur

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. J.H.R. Kägi

Zürich 1986
Copy Quick Zürich



Spektroskopische und proteinchemische Studien an tierischen und pflanzlichen Metallothioneinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
WERNER ROBERT BERNHARD
aus Winterthur

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. J.H.R. Kägi

Zürich 1986
Copy Quick Zürich



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507228_0047

SPEKTROSKOPISCHE UND PROTEINCHEMISCHE STUDIEN
AN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN METALLOTHIONEINEN

TEIL I:

Charakterisierung von Hg-Metallothionein durch optische
Spektroskopie, Potentiometrie und chemische Modifikationen

TEIL II:

Untersuchung der Clusterbildung in Cd-Metallothionein
durch differentielle Modifikation

TEIL III:

Isolation und Charakterisierung von Cd-bindenden
Polypeptiden aus Mais-Wurzeln

für Beate

Dank

Ich möchte Herrn Prof. Kägi für seine Anteilnahme an dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung und die gebotenen Möglichkeiten danken. Weiter danke ich Dr. M. Vasak für seine Anregungen und Hilfe bei der Lösung von theoretischen wie praktischen Problemen. Mein Dank gilt auch Prof. W. E. Rauser (University of Guelph) für die Einführung in die Zucht von Mais und die Präparation der Cd-bindenden Polypeptide aus deren Wurzeln.

Bei meinen Kollegen H. Willner, P. Hunziker, D. Gilg und M. Good möchte ich mich für alle praktische Hilfe und die anregenden Diskussionen bedanken. Ebenso danke ich Frau M. Sutter für die Präparation des nötigen Metallothioneins.

**Resultate aus der vorliegenden Arbeit sind
in folgenden Artikeln publiziert worden**

- Bernhard, W.R., Good, M., Vasak, M. & Kägi, J.H.R.
Spectroscopic Studies and Characterization of Metallothioneins containing Mercury, Lead and Bismuth.
Inorg. Chem. Acta (1983) 79, 154
- Kägi, J.H.R., Vasak, M., Lerch, K., Gilg, D.E.O., Hunziker, P., Bernhard, W.R. & Good, M.
Structure of Mammalian Metallothionein
Environ. Health Perspect. (1984) 54, 93
- Bernhard, W.R., Vasak, M. & Kägi, J.H.R.
Cd Binding and Cluster Formation in Metallothionein: A Differential Modification Study
Biochemistry (1986), im Druck
- Bernhard, W.R., Vasak, M. & Kägi, J.H.R.
Cd Binding and Cluster Formation in Metallothionein
(1985) in Metallothionein, Proceedings of the "Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins", Zürich, 1985, (Eds. Kägi, J.H.R. and Kojima, Y.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1986, im Druck
- Bernhard, W.R. & Kägi, J.H.R.
Purification and Characterization of atypical Cd-binding Polypeptides from Zea Mais
(1985) in Metallothionein, Proceedings of the "Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins", Zürich, 1985, (Eds. Kägi, J.H.R. and Kojima, Y.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1986, im Druck

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassungen	5
1. Einführung	9
1.1 Metallothionein	9
1.2 Biochemische Eigenschaften von Metallothionein	10
1.3 Molekularbiologie von Metallothionein	11
1.4 Physiologische Funktionen von Metallothionein	13
1.5 Cd-bindende Polypeptide in höheren Pflanzen	14
I. TEIL:	
Charakterisierung von Hg-Metallothionein durch optische Spektroskopie, Potentiometrie und chemische Modifikationen	17
2. Einleitung	17
2.1 Hg-Vergiftung und Metallothionein	17
2.2 Chemie der Hg-S Verbindungen, Modellverbindungen	18
2.3 Ausgangslage, Fragestellungen	20
3. Materialien und Methoden	21
3.1 Das verwendete Protein	21
3.2 Herstellung von Apo-Metallothionein	21
3.3 Metallbestimmungen	22
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	23
3.5 Rekonstitution von Hg-Metallothionein	24
3.6 UV-, CD-, und MCD-Spektroskopie	24
3.7 Differentielle Modifikation von Hg ₇ -Metallothionein	25
3.8 Modifikationen mit DTNB	26
3.9 pH-Abhängigkeit der UV-, CD- und MCD-Spektren	26
3.10 Potentiometrische Titration von Hg ₇ -Metallothionein	26
3.11 Ladungsbestimmung von Hg ₇ -Metallothionein	29
3.12 Bestimmung des Stokes' Radius	30

4. Resultate	31
4.1 Die Bindung von Hg(II) an Metallothionein	31
4.2 Optische Spektroskopie von Hg-Metallothionein	33
4.3 Optische Spektroskopie von (Hg,Zn) ₇ -Metallothionein	39
4.4 Modifikation von Hg-Metallothionein mit DTNB	41
4.5 Ladung von Hg ₇ -Metallothionein	43
4.6 Stokes' Radien von Hg ₇ - und Hg ₁₀ -Metallothionein	44
4.7 Differentielle Modifikation von Hg ₇ -Metallothionein	46
4.8 pH-Abhängigkeit der optischen Spektren von Hg ₇ -Metallothionein	49
4.9 Potentiometrische Titration von Hg ₇ -Metallothionein	51
5. Diskussion	55
5.1 Kinetische und thermodynamische Aspekte der Bindung von Hg(II) an Metallothionein	55
5.2 Optische Spektroskopie von Hg-Metallothionein	57
5.3 pH-Titration von Hg ₇ -Metallothionein	64
5.4 Form und molekulare Dynamik von Hg-Metallothionein	66
5.5 Koordination und Organisation der an Metallothionein gebundenen Hg-Ionen	68
 II. TEIL	
Untersuchung der Clusterbildung in Cd-Metallothionein durch differentielle Modifikation	
	71
6. Einleitung	71
6.1 Ausgangslage, Problemstellungen	71
6.2 Zur Methode der differentiellen Modifikation	72
7. Materialien und Methoden	73
7.1 Das verwendete Metallothionein	73
7.2 Rekonstitution von Cd-Metallothionein	74
7.3 Kinetik der Modifikation mit Jodacetamid und DTNB	74
7.4 Differentielle Modifikation mit ¹⁴ C-Jodacetamid	75
7.5 Behandlung von Cd ₇ -Metallothionein mit EDTA	75
7.6 Verdauung und Peptid-Fraktionierung	77

7.7 Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	77
8. Resultate	78
8.1 Kinetik der Modifikation mit Jodacetamid und DTNB	78
8.2 Differentielle Modifikation von Cd-Metallothionein	78
8.3 Identifikation der schwächsten Bindungsstelle	84
9. Diskussion	85
9.1 Anwendbarkeit der differentiellen Modifikation	85
9.2 Kinetik der Modifikationsreaktionen	86
9.3 Der Aufbau von Cd-Metallothionein	86
9.4 Thermodynamische Überlegungen	88
9.5 Vergleich mit anderen Schwermetallionen	90
 III. TEIL:	
Isolation und Charakterisierung von Cd-bindenden Polypeptiden aus Mais-Wurzeln	91
10. Einleitung	91
10.1 Ausgangslage und Zielsetzungen	91
11. Materialien und Methoden	92
11.1 Maissorte und Zuchtbedingungen	92
11.2 Ernte und Lagerung der Maiswurzeln	93
11.3 Aufschluss und Extraktion	94
11.4 Ionentauscherchromatographie über QAE-Sephadex	95
11.5 Gelfiltration über Sephadex G-50	95
11.6 Pyridyläthylierung	95
11.7 Fraktionelle Modifikation von Phytochelatin	96
11.8 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	96
11.9 Fraktionierung der Pyridyläthyl-Derivate	97
11.10 Aminosäureanalysen	97

12. Resultate	98
12.1 Extraktion und Chromatographie	98
12.2 Pyridyläthylierung, Carboxyamidomethylierung und Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	100
12.3 Fraktionelle Modifikation mit Jodacetamid und Vinylpyridin	102
12.4 Fraktionierung der pyridyläthylierten Peptide	104
13. Diskussion	105
13.1 Reindarstellung von nativem Phytochelatin	105
13.2 Cd-Bindungseigenschaften und Koordination	106
13.3 Das Problem der Disulfidbrücken	107
13.4 Molekulargewicht der Cd-bindenden Komplexe	108
13.5 Evidenz für α -Glutamyl-Bindungen	109
13.6 Weitere Arbeiten, Probleme	109
14. Anhang	111
14.1 Literaturverzeichnis	111
14.2 Abkürzungen	115
14.3 Verzeichnis der Tabellen und Figuren	117
14.4 Lebenslauf	119

ZUSAMMENFASSUNGEN

I. TEIL

Charakterisierung von Hg-Metallothionein durch optische Spektroskopie, Potentiometrie und chemische Modifikationen

Hg-Ionen binden in wässriger Lösung bei jedem pH stark an die Cys von Metallothionein. Trotz der hohen Affinität bilden sich monomere Komplexe, wobei Hg_7 -Metallothionein als einzige Spezies bei neutralem pH stabil ist. Komplexe mit weniger als 7 mol Hg/mol MT werden durch Luftsauerstoff oxidiert und solche mit mehr Hg präzipitieren.

Das UV-Spektrum von Hg-Metallothionein zeigt eine charakteristische Schulter bei 300 nm, welche ihre maximale Intensität bei 7 mol Hg/mol MT erreicht und bei weiterer Zugabe von Hg(II) rasch abnimmt. Wird der Aufbau von Hg-Metallothionein mittels CD- und MCD-Spektroskopie verfolgt, so zeigen sich Änderungen in der Form und Intensität der Spektren mit 3, 7 und 10 mol Hg/mol MT, welche darauf hindeuten, dass sich die Organisation der gebundenen Hg-Ionen und deren Koordination beim Überschreiten dieser Hg/Protein-Verhältnisse verändern.

Die optische Spektroskopie von Hg-Metallothionein zeigt viele Gemeinsamkeiten mit derjenigen von Cd- und Zn-Metallothionein und gehorcht wie diese der semiempirischen Theorie über die Lage des langwelligsten Ligand→Metall Charge-Transfer (LMCT) Übergangs von Jörgensen (1970), welche auf Grund der optischen Elektronegativitäten von Hg(II) und der Thiolat-liganden bei tetraedraler Koordination einen Wert von 303 nm vorher-sagt. Die gute Übereinstimmung der Position des ersten LMCT-Übergangs mit der Voraussage der Theorie von Jörgensen und der grossen Ähnlichkeit den optischen Spektren von Cd-Metallothionein wird als wichtiger Hinweis für tetraedrale Geometrie der Hg-Thiolat-Komplexe in Hg_7 -Metallothionein betrachtet.

Weitere Ähnlichkeiten zwischen Hg_7 -Metallothionein und Cd_7 -Metallothionein bestehen in der Abhängigkeit ihres Stokes' Radius von der Ionenstärke und in der unterschiedlichen Stabilität der beiden Cluster, wo in beiden Fällen der Cd_3 -Cluster kinetisch labiler ist als der Cd_4 -Cluster.

Die Unterschiede zwischen Hg_7 - und Cd_7 -Metallothionein werden vor allem durch die unterschiedliche Affinität der beiden zweiwertigen Ionen gegenüber der Mercaptogruppe von Cys bestimmt. So sind in Hg_7 -Metallothionein im Gegensatz zu Cd_7 -Metallothionein nicht alle Cys mit DTNB modifizierbar und bei saurem pH dissoziieren die Hg-Ionen im Gegensatz zu den Zn- und Cd-Ionen nicht vom Protein. Trotzdem werden einige Hg-Thiolat-Bindungen bei pH 7 und 5.4 protoniert, was bedeutet, dass nicht alle Cys-Seitenketten gleich stark an die Hg-Ionen gebunden sind, und einige Daten weisen darauf hin, dass mit abnehmendem pH die tetraedrale Koordination in die lineare übergeht.

II. TEIL

Untersuchung der Clusterbildung in Cd-Metallothionein durch differentielle Modifikation.

Metallothioneine besitzen 20 Cysteine und binden 7 Metallionen. Diese sind in zwei getrennten Thiolat-Clustern von 3 und 4 Metallionen am N- und C-Terminus des Proteins angeordnet (Frey et al., 1985). In Cd-Metallothionein wurde mittels differentieller Modifikation der Aufbau und die Stabilität dieser beiden Cluster untersucht. Zu diesem Zweck wurden Cd-Metallothioneine mit 1 bis 7 mol Cd/mol MT rekonstituiert und anschliessend der differentiellen Modifikation mit ^{14}C -Jodacetamid unterworfen.

Bis zu 2 mol Cd/mol MT wurden keine Cys-Mercaptogruppen speziell gegen die Modifikation mit Jodacetamid abgeschirmt, was auf eine zufällige Verteilung der komplexierten Cd-Ionen hindeutet. Zwischen 3 und 5 mol Cd/mol MT weisen die unterschiedlichen Reaktivitäten der Cys auf die Bildung des C-terminalen 4 Cd-Clusters hin. Bei weiterer Zugabe von Cd wird der 3 Cd-Cluster vom N-Terminus her aufgebaut. Vergleicht man Cd_6 - und

Cd_7 -Metallothionein, so stellt man fest, dass das am schwächsten gebundene Cd-Ion hauptsächlich mit Cys-Resten zwischen den Sequenzpositionen 20 und 30 komplexiert ist.

Die Markierung der Cys in Cd_7 -MT im Vergleich zu Cd_6 -MT zeigt, dass der C-terminale Cluster durch den vollbesetzten Cd_3 -Cluster zusätzlich stabilisiert wird. Weiter sind die Cys der N-terminalen Hälfte der Modifikation mit Jodacetamid 3 mal leichter zugänglich als diejenigen der C-terminalen, was darauf hindeutet, dass der, Cd_3 -Cluster kinetisch und thermodynamisch labiler ist als der Cd_4 -Cluster.

III. TEIL

Isolation und Charakterisierung von Cd-bindenden Polypeptiden aus Mais-Wurzeln

Aus den Wurzeln von mit $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ vergiftetem Mais werden unter Luftausschluss Cd-enhaltende Peptide extrahiert und mit Ionentauscher-Chromatographie gereinigt. Durch Gelfiltration werden die erhaltenen Cd Komplexe in zwei Gruppen mit apparenten Molekulargewichten von 3500 und 8000 aufgetrennt. Nach beiden Reinigungsschritten beträgt die Ausbeute an Cd mehr als 90 %. Das ungefähre Verhältnis der Aminosäuren der Fraktion mit dem kleineren Molekulargewicht ist Glu : Cys : Gly = 8 : 7 : 1 und dasjenige der anderen Fraktion 9 : 8 : 1 .

Die weitere Charakterisierung erfolgte mittels unterschiedlicher Modifikation von Cystein und Cystin. Für die Modifikation des ersteren wurde Material beider Fraktionen nach der Gelfiltration ohne vorherige Reduktion mit Jodacetamid inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde Cystin mit DTE reduziert und mit Vinylpyridin modifiziert. Es zeigte sich, dass im kleineren Komplex 60 % und im grösseren 30 % der Cys an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. In beiden Komplexen aber betrug das Verhältnis der Thiolat-Gruppen zu den Cd-Ionen etwa 2.

Da sich zeigte, dass diese Cd-bindenden Komplexe aus mehreren verschiedenen Peptiden bestanden, wurden diese nach Reduktion mit DTE mit

Vinylpyridin modifiziert. Die so erhaltenen pyridyläthylierten Peptide wurden in der Folge über 'reverse phase' HPLC aufgetrennt. Dabei zeigte sich, dass beide Komplexe aus den gleichen Peptiden in unterschiedlichem Verhältnis gebildet wurden, wobei vier dieser Peptide zusammen mehr als 90 % aller Aminosäuren enthielten und am N-terminalen Ende Glutaminsäure aufwiesen.

Es zeigt sich, dass diese Peptide grösser sind als diejenigen, die aus Dikotyledonen isoliert und sequenziert worden sind. Da die Peptide aus Mais weder durch Endo- noch durch Exopeptidasen verdaut werden können, ist es wahrscheinlich, dass sie wie diejenigen aus Dikotyledonen ebenfalls γ -Glutamyl-Bindungen enthalten.

1. EINFÜHRUNG

1.1 Metallothionein

Metallothionein wurde von Margoshes & Vallee (1957) erstmals aus Pferdenieren isoliert. Anfangs der Sechzigerjahre wurde dieses Material von Kägi & Vallee, 1960; 1961) charakterisiert. 1976 wurde die Sequenz dieses Proteins ermittelt (Kojima et al., 1976). Erst 1985 wurde die dreidimensionale Struktur von Metallothionein mittels 2D-NMR Spektroskopie (Frey et al., 1985) und Röntgenstrukturanalyse (Furey et al., 1986) bestimmt.

Da eine enzymatische Funktion fehlt, ist es notwendig, Metallothionein auf Grund seiner Struktur zu definieren. Kojima und Kägi (1979) benutzten folgende Kriterien zur Definition von Metallothionein:

1. Hoher Cystein-Gehalt (20 - 33 mol %) und das Fehlen von Histidin und aromatischen Aminosäuren.
2. Hoher Gehalt an Schwermetallionen, welche durch die Cysteinreste komplexiert werden.
3. Niedriges Molekulargewicht ($< 10'000$)

Metallothioneine wurden bis heute aus Vertebraten (Kägi und Vallee, 1960), Invertebraten (Olafson et al., 1979) und Mikroorganismen (Lerch, 1979) isoliert. Alle bis heute isolierten und charakterisierten Formen binden natürlicherweise Zn(II)-, Cd(II)- und Cu(I)-Ionen. Andere Metallionen, u.a. Hg(II)-, Bi(III)-Ionen, wurden nach Aufnahme oder Injektion in Metallothioneinen aus Säugern in kleinen Mengen gefunden (Zelazowski & Pietrowski, 1980; Szymanska & Stillman, 1982).

1.2 Biochemische Eigenschaften von Metallothionein

Die folgende Darstellung der biochemischen Eigenschaften von Metallothionein beschränkt sich auf die aus Vertebraten isolierten Proteine. In allen Säugern werden mehrere Isoproteine gefunden, die auf Grund ihrer chromatographischen Eigenschaften auf schwach basischen Ionentauschern in die Isoformen 1 und 2 (MT-1 und MT-2) unterteilt werden. Diese können ihrerseits ebenfalls wieder Mischungen von mehreren Isoproteinen sein. Beim Kaninchen ist Metallothionein 1 aus 3 Isoproteinen zusammengesetzt (Klauser et al., 1983), beim Menschen aus deren 5 (Hunziker & Kägi, 1985). In beiden Spezies besteht die Isoform 2 nur aus einem Isoprotein. Bis heute hat man keine Unterschiede in den Cd-Bindungseigenschaften zwischen den einzelnen Isoformen derselben Spezies bemerkt. Dasselbe scheint auch für Metallothioneine von verschiedenen Säugern zu gelten.

Mit einer Ausnahme besitzen alle Säugermetallothioneine eine Sequenz von 61 Aminosäuren mit 20 Cystein- und 7 - 9 Lysin- plus Argininreste. Metallothionein ist ein konservatives Protein, da in allen bekannten Formen etwa zwei Drittel der Sequenzpositionen identisch besetzt sind. Zu den invarianten Aminosäuren gehören alle Cysteine und die basischen Aminosäuren.

Auf Grund der dreidimensionalen Strukturen von Säugermetallothioneinen, welche mittels 2D-NMR Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse erhalten wurden, werden die Zn- und Cd-Ionen in 2 separaten Metall-Thiolat-Clustern von 3 und 4 Ionen gebunden, wobei die 9 N-terminalen Cysteinreste den β -Cluster (3 Metallionen) aufbauen und die 11 C-terminalen Cysteinreste an der Bildung des α -Clusters (4 Metallionen) beteiligt sind. Die Metallionen des β -Clusters werden durch 6 terminale Liganden und 3 Brückenliganden in Wannenform (wie Cyclohexan) gebunden. Im α -Cluster sind die 4 Metallionen in einer adamantanähnlichen Struktur durch 6 terminale und 5 Brückenliganden koordiniert. Die basischen Aminosäuren (Lys, Arg) ihrerseits bewirken durch die Neutralisierung der negativen Überschussladung innerhalb der Metall-Thiolat-Cluster eine Stabilisierung der Struktur von Metallothionein (Pande et al., 1985).

Auf Grund von potentiometrischen Studien weiss man, dass der C-terminale α -Cluster Cd-Ionen etwa 40 mal stärker bindet als der N-terminale β -Cluster (Vasak & Kägi, 1983). Zn-Ionen scheinen hingegen vorzugsweise an der N-terminalen Hälfte des Moleküls gebunden zu werden, sind doch in

(Zn₂,Cd₅)-Metallothionein-2, das aus Lebern von Cd-vergifteten Ratten isoliert wurde, die beiden verbleibenden Zn-Ionen im β -Cluster gebunden (Furey et al., 1986).

In Metallothioneinen sind meist mehrere verschiedene Metallionen gleichzeitig gebunden. In Säugern, die nicht mit erhöhten Dosen von Schwermetallionen in Kontakt gekommen sind, findet man überwiegend Zn, wenig Cd und Cu, in Metallothionein aus Föten oder neu geborenen Tieren sind hingegen Zn- und Cu-Ionen in etwa gleichen Mengen vorhanden.

Fast alle Erkenntnisse über die Metall-Bindungseigenschaften von Metallothionein sowie die dreidimensionale Struktur wurden mit Hilfe spektroskopischer Techniken an Proteinen erarbeitet, die nur eine Art von Metallionen enthielten. Zu deren Herstellung werden die an natives Metallothionein gebundenen Ionen entfernt und in definierter Art und Weise wird das Protein mit gleichartigen Metallionen rekonstituiert. So sind Metallothioneine hergestellt worden, die nur Zn(II), Cd(II), Hg(II), Co(II), Ni(II) und Pb(II) enthalten. Aber auch Mischungen zwischen diesen Ionen sind möglich (diese Arbeit, Good et al., 1986). Während bei der Rekonstitution von Apo-Metallothionein, 7 der oben erwähnten Ionen einen definierten Komplex mit Metallothionein bilden, werden Cu(I)- und Ag(I)-Ionen durch Metallothionein anders gebunden. Die bis heute vorliegenden Daten lassen keine eindeutigen Schlüsse über Struktur und Stöchiometrie dieser Metallothioneine zu.

1.3 Molekularbiologie von Metallothionein

Für Metallothionein kodierende Nukleotidsequenzen wurden als cDNA und als genomische DNA geklont. In cDNA-Klonen entspricht das erste AUG dem N-terminalen Methionin und das erste Stop-Codon folgt direkt auf das C-terminale Alanin oder Aspartat, was bedeutet, dass die Acetylierung des N-Terminus die einzige posttranslationelle Modifikation darstellt.

Metallothionein-Gene wurden aus der Maus und aus menschlicher DNA isoliert. Beim Menschen wurden bis heute vier funktionelle Gene und fünf Pseudogene identifiziert. Erstaunlicherweise konnten bis heute nicht alle Genprodukte dieser funktionellen Gene identifiziert werden. Ebenso wurden noch nicht alle Gene für die bis heute isolierten menschlichen Isoproteine

gefunden. Alle bis heute bekannten Metallothionein-Gene zeigen dieselbe Struktur mit 2 Introns und 3 Exons. Exon 1 codiert für die 5' nichttranslatierte Region (≈ 70 bp) und die Aminosäurereste 1 - 8 $\frac{2}{3}$. Exon 2 codiert für die Aminosäuren 9 - 31 $\frac{1}{3}$ und Exon 3 für die Aminosäuren 31 $\frac{2}{3}$ und die 3' nicht translatierte Region (≈ 130 bp) (Hamer, 1986). Die Intronlängen variieren, deren Grenzen besitzen aber alle die Splicingsignale GT.....AG und tragen das Signal für die Polyadenylierung. Auf Grund dieser Struktur lässt sich sagen, dass es sich bei den bis heute bekannten Metallothionein-Genen um typische, bei höheren Eukaryonten vorkommende Gene handelt (Hamer, 1986).

Transkription und Translation der Metallothionein-Genfamilie werden rasch und vorübergehend durch Schwermetallionen induziert. In Säugetieren erfolgt die Induktion zusätzlich durch Glucocorticoide, Interferon, Interleukin I, Glucagon, Angiotensin II und durch ionisierende Strahlung (Failla & Cousins, 1978; Cousins, 1986; Liebermann et al., 1983).

Die DNA-Sequenzen, die für die Induktion durch Schwermetallionen verantwortlich sind, liegen etwa 40 und 150 bp vom Startkodon der Translation entfernt. Dabei handelt es sich um kurze Stücke, die umso stärker als Promotoren wirken, je häufiger sie sich wiederholen. (Searle et al., 1984). Zusätzlich wurden auch Enhancer-Sequenzen gefunden, die zwischen den beiden Promotoren positioniert sind. Über die Induktionssequenzen für die anderen induzierenden Faktoren ist erst wenig bekannt, aber auf Grund der vorhandenen vielfältigen Möglichkeiten der Induktion von Metallothionein wird angenommen, dass durch das Zusammenwirken von mehreren Regulationsfaktoren die Transkription der Metallothionein-Gene sehr präzise, und der jeweiligen Situation angepasst, reguliert werden kann.

Über den Mechanismus der Induktion und der Genregulationen ist ebenfalls wenig bekannt. Allgemein wird aber angenommen, dass die Induktion durch Schwermetallionen über ein DNA-bindendes Protein erfolgt (Hamer 1986). Wegen der Möglichkeit von unterschiedlichen Metallbindungseigenschaften dieses Proteins und Metallothionein, würde diese Hypothese auch erklären, warum Metallothionein durch Schwermetallionen induziert wird, die nicht oder nur in geringen Mengen an Metallothionein binden (Pb, Hg).

1.4 Physiologische Funktionen von Metallothionein

Trotz der weiten Verbreitung der Metallothioneine bei Tieren und Mikroorganismen ist bis heute deren Funktion nicht bekannt. Dass Metallothionein eine wichtige Funktion hat, lässt sich nicht nur aus seinem ubiquitären Vorkommen in Tieren und Mikroorganismen vermuten, sondern wird auch durch die Konservierung seiner Aminosäuresequenz bestätigt.

Da in allen Spezies Metallothioneine durch Schwermetalle induziert werden, liegt es nahe, dass sie eine Funktion in der Entgiftung und/oder Speicherung dieser Schwermetalle haben. Andererseits scheint Metallothionein wenigstens in Säugern noch andere Aufgaben zu erfüllen, da es in diesen ebenfalls durch Stresszustände, wie Hitze- und Kälteexposition, Verbrennungen, Infekte und Vergiftungen induziert wird. Dies stimmt gut damit überein, dass die Metallothionein-Synthese durch Steroidhormone stimuliert wird, ist doch unter Stress die Konzentration der zirkulierenden Glucocorticoide erhöht und die Aufnahme von Zn in das Zellinnere stimuliert (Cox & Ruckstein, 1971). Aus diesen Fakten könnte eine Funktion von Metallothionein im Zn-Stoffwechsel abgeleitet werden.

Interessant ist ebenfalls, dass Metallothionein durch ultraviolettes Licht und andere ionisierende Strahlung induziert wird (Liebermann et al., 1983). Diese Induktion findet vor allem in der Leber statt, auch wenn Versuchstiere an irgend einer anderen Stelle des Körpers ionisierender Strahlung ausgesetzt waren. Es wurde auch gezeigt, dass kleine Dosen von Cd Zellkulturen gegen Röntgenstrahlung unempfindlicher werden lassen (Müller et al., 1982).

Auf Grund dieser experimentellen Ergebnisse untersuchten Thorndelley und Vasak (1985) das Verhalten von Metallothionein gegenüber in biologischen Systemen vorkommenden Radikalen. Dabei stellte sich heraus, dass gelöstes Metallothionein diese Radikale in diffusionskontrollierter Reaktion unter Bildung von Disulfidbrücken abfängt. Metallothionein könnte deshalb auch ein Teil eines induzierbaren Schutzsystems gegen ionisierende Strahlung sein.

1.5 Cd-bindende Polypeptide in höheren Pflanzen

Im Gegensatz zu tierischen Lebewesen und Mikroorganismen konnte aus höheren Pflanzen bisher noch kein Metallothionein isoliert werden. Pflanzen ertragen aber im Vergleich zu Tieren sehr hohe Dosen an Cd, das je nach Pflanzenart verschieden, hauptsächlich in den Wurzeln (Mais), Blättern (Kohl) oder Früchten (Tomate) durch Cd-bindende Polypeptide gebunden wird. Diese Cd-bindenden Polypeptide bestehen hauptsächlich aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin. In einigen Fällen sind auch Asparaginsäure, Serin und Histidin als weitere Aminosäuren vorhanden (*Agrostis gigantea*). Bis heute wurde noch keiner dieser Cd-bindenden Komplexe in nativer, homogener Form aus Pflanzen isoliert. Auch das Molekulargewicht dieser Komplexe ist nicht genau bekannt, wurden doch Werte zwischen 3000 und 11'000 publiziert. In einigen Fällen scheint das apparente Molekulargewicht bei Gelfiltration dieser Cd-bindenden Proteine von der Ionenstärke des verwendeten Puffers abzuhängen (Wagner, 1984).

Am 'Zweiten Internationalen Meeting' über Metallothioneine in Zürich präsentierten Grill et al. (1985) Sequenzen von Peptiden, die aus Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina* (Hundsgiftgewächs, Dikotyledone) nach Induktion mit Cd isoliert worden waren. Diese Peptide haben die Sequenzen $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$, mit $n = 3 - 7$. Etwas später, auch im Zusammenhang mit dem erwähnten Kongress, publizierten Robinson et al. (1986) die Sequenz von Peptiden von Cd-bindenden Proteinen aus *Datura innoxia* (Nachtschattengewächs, Dikotyledone). Sie fanden nur ein Peptid, nämlich $(\gamma\text{Glu-Cys})_3\text{Gly}$. In Monokotyledonen (*Agrostis gigantea*, *Zea mais*) ist die Aminosäurezusammensetzung anders, hier übersteigt die Anzahl der Glutaminsäurereste deutlich die Anzahl der Cysteine. Es scheint, dass die Strukturen der Cd-bindenden Komplexe sich substantiell von denjenigen der Dikotyledonen unterscheiden (diese Arbeit; Rauser & Glover, 1983).

Das Vorkommen dieser Art von Cd-bindenden Proteinen scheint jedoch nicht nur auf die höheren Pflanzen beschränkt zu sein. Auch aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Murasugi et al., 1981) wurde nach Induktion mit Cd ein Cd-bindendes Polypeptid isoliert. Die Aminosäurezusammensetzung war dieselbe, wie die von Robinson et al. (1986) publizierte, nämlich: Glu : Cys : Gly = 3 : 3 : 1. Zusätzlich zu den Cysteinen sind aber in diesen

Polypeptiden noch S^{2-} -Ionen an der Bindung des Cd beteiligt. Ähnlich wie beim Mais scheint es aber zwei Klassen von Cd-bindenden Komplexen zu geben mit apparenten Molekulargewichten von 4000 und 10'000.

Diese Cd-bindenden Polypeptide sind aufgrund des Verknüpfungsmodus der Aminosäuren keine primären Gen-Produkte, obwohl auch sie durch Cd und andere Schwermetalle induziert werden können. Als Name für diese Cd-bindenden Polypeptide ist Phytochelatin vorgeschlagen worden (Grill et al., 1985). Dieser Name wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es ist aber auch vertretbar, diese Verbindungen als Subklasse der auf Seite 9 phänotypisch definierten Metallothioneine zu betrachten.

I. TEIL

CHARAKTERISIERUNG VON Hg-METALLOTHIONEIN DURCH OPTISCHE SPEKTROSKOPIE, POTENTIOMETRIE UND CHEMISCHE MODIFIKATIONEN

2. EINLEITUNG

2.1 Hg-Vergiftung und Metallothionein

Hg interagiert mit vielen zellulären Strukturen und beeinträchtigt das normale Funktionieren der Zelle und damit des gesamten Organismus. Es ist deshalb für Lebewesen toxisch. Wegen seiner weiten Verbreitung in der Biosphäre haben sich im Laufe der Evolution Schutzmechanismen entwickelt. In Mikroorganismen wird Hg deshalb als unlösliche Komplexe mit schwefelhaltigen Liganden oder reduziert als metallisches Hg in Vakuolen gelagert. Einige Bakterien synthetisieren aus aufgenommenem Hg Methyl-Hg und scheiden diese lipophile Verbindung durch die Zellmembran in die Umgebung aus (Vallee & Ulmer, 1972).

Für höhere Lebewesen stehen mehrere Mechanismen zur Entgiftung zur Diskussion. Als die beiden wichtigsten seien die Methylierung und die darauf folgende Deponierung in stark fetthaltigem Gewebe sowie die Bindung an Gluthathion erwähnt. Dabei scheint es sich in beiden Fällen um eine mittel- oder kurzfristige Entgiftung zu handeln. Inwieweit langfristige Schutzmechanismen nötig sind, ist nicht klar, da im Gegensatz zu Cd ($t_{1/2} \approx 20$ a) Hg innert Wochen bis Monaten wieder ausgeschieden wird. Diese Ausscheidung erfolgt bei anorganisch gebundenem Hg u.a. als Cystein Komplexe durch die Nieren (Taylor & Carty, 1977) oder bei lipophilen Alkyl-Derivaten mit der Galle (Vallee & Ulmer, 1972).

Wie weit Metallothionein eine Rolle bei der Entgiftung von Hg spielt, ist nicht klar. Selbst in Tieren, die mit hohen Dosen HgCl_2 vergiftet wurden, fand man nur kleine Mengen des verabreichten Hg's an MT gebunden (Pio-

trowsky & Zelazowsky, 1980). In den meisten Fällen war der Hg-Gehalt des aus diesen Tieren isolierten MT's etwa 1 mol Hg/mol MT (Holt et al., 1980). Trotzdem wird die MT-Synthese bereits durch niedrige Dosen von Hg(II) stark erhöht (Durnam et al., 1981), dabei findet man in der Leber nur Zn-MT, und in den Nieren Zn-MT mit wenig Hg(II) gebunden. Dies stimmt auch damit überein, dass durch die Verabreichung von kleinen Dosen von Hg(II) die Zn-Aufnahme sowie die Proteinsynthese stimuliert wird (Kägi & Hapke, 1984). Dass nur so wenig Hg an MT gebunden wird, könnte damit erklärt werden, dass die hohe Affinität von Hg(II) gegenüber SH-Gruppen dazu führt, dass das meiste an Proteine und Glutathion bindet. Während die Proteine dadurch in ihrer natürlichen Funktion behindert werden, könnte Glutathion eine wichtige Rolle in der Entgiftung von Hg spielen. Vor allem auf Grund seiner relativ hohen Konzentration in den Zellen (1 - 10 mM) dürfte es einen gewissen Schutz vor Hg vermitteln (Kägi und Hapke, 1984).

Die Tatsache, dass Hg(II) die Bildung von MT induziert, ist noch kein Grund zur Annahme, dass MT in dessen Entgiftung eine Rolle spielt, ist doch dasselbe auch von anderen Schwermetallionen wie Mn(II), Cr(III), In(III) und Pb(II) bekannt. Die Bindung von Hg an MT ist eher auf dessen relativ hohe Konzentration in der Zelle sowie den hohen Anteil an SH-Gruppen, als auf dessen Spezifität für dieses Ion zurückzuführen.

2.2 Chemie der Hg-S Verbindungen, Modellverbindungen

Hg ist wie Zn und Cd ein Element der Gruppe IIB. Hg(II) hat also wie Zn(II) und Cd(II) d^{10} als äussere Elektronenkonfiguration. Vergleicht man diese Ionen (Tabelle 2.I), so stellt man fest, dass deren Affinität zu Thiolat-Gruppen mit zunehmendem Atomgewicht stark ansteigt. Dieser Anstieg lässt sich durch die zunehmende Polarisierbarkeit der Elektronenhülle erklären, welche dazu führt, dass sich die Fähigkeit mit den polarisierbaren ('weichen') Thiolat-Gruppen eine Bindung einzugehen, stark erhöht. Aus demselben Grund sind die Affinitäten von Hg(II) zu Cl^- und I^- verglichen mit denjenigen von Zn(II) und Cd(II) ebenfalls sehr hoch.

Die hohe Affinität von Hg(II) für Thiolat-Gruppen und die Tendenz zur Bildung von linearen und verbrückten Komplexen erschwert die Herstellung

Tabelle 2.I: Vergleich von Hg(II) mit Zn(II) und Cd(II) und deren Eigenschaften in tetraedralen Thiolat-Komplexen mit Cystein und MT (Cotton & Wilkinson, 1974; Bürgi, 1974; Taylor & Carty, 1977; Dance, 1978; Swenson et al., 1978).

Me(II)	Ionen- Radius Å	Me-S Bindungslänge terminal Å	Brücken Å	Bindungskonstante* in Me ₇ -MT bei pH 7 pK _d
Zn(II)	0.69	2.27	2.35	12.3
Cd(II)	0.92	2.54	2.54±	16.3
Hg(II)	0.93	2.46	2.49	≈30**

* Vasak & Kägi, 1983

** Kägi & Hapke, 1984; geschätzt

und Charakterisierung von Hg-Thiolat-Komplexen enorm, vor allem, da deren Löslichkeit in Wasser äusserst limitiert ist. Als Extremfall sei hier HgS erwähnt, von dem sich nur einige Moleküle in einem m³ Wasser lösen (pK_S ≈ 54). Dies hat dazu geführt, dass nur wenig über diese Komplexe bekannt ist, so sind z.B. bis heute keine UV-, CD- oder MCD-Spektren von solchen Verbindungen verfügbar.

Hg(II) ist wie Zn(II) und Cd(II) in seinen Komplexen mit Cystein tetraedral gebunden, wobei Hg(II) nur mit zwei Thiolat-Gruppen koordiniert ist, die anderen zwei Liganden sind Chlorid-Ionen. Dafür bilden ein Teil der Thiolat-Gruppen Brücken zwischen zwei Hg-Ionen (Taylor & Carty, 1977). In Tabelle 2.I sind die Ionenradien, Bindungslängen von terminalen und verbrückten Liganden, sowie die Dissoziationskonstanten der entsprechenden zweiwertigen Ionen zu MT bzw. Cys zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass trotz nahezu gleichen Ionenradien von Hg und Cd die Hg-S-Bindung kürzer ist und deren Bindungslängen zwischen denjenigen von Cd-S und Zn-S Bindungen liegen. Dies lässt zumindest die sterische Möglichkeit für einen gleichartigen Komplex mit Hg(II) mit MT, wie er mit Zn(II) und Cd(II) besteht, offen.

Über die optische Spektroskopie der oben erwähnten Hg(II)-Cys-Komplexe ist nichts bekannt. Die einzige Verbindung, in der bekannterweise Hg(II) tetraedral durch 4 S-Atome koordiniert ist, und von der zugleich ein UV-Spektrum der Ligand→Metall Charge-Transfer Übergänge (LMCT-Übergänge) erhalten wurde, ist $K_2Hg(SCN)_4$ (Jørgensen, 1970). Dieses zeigt bei 280 nm das Absorptionsmaximum des langwelligsten CT-Übergangs. Wegen der recht unterschiedlichen Elektronenstruktur des Rhodanid-Anions verglichen mit dem Thiolat-Anion, ist diese Verbindung jedoch nur beschränkt als Modellverbindung zu betrachten. Immerhin gibt sie aber Hinweise über die Lage der LMCT-Übergänge in tetraedralen Komplexen von Hg(II), die mit 4 Thiolat-Liganden koordiniert sind.

2.3 Ausgangslage, Fragestellungen

Zu Beginn der Arbeiten an Hg-MT standen vor allem Fragen über die Spektroskopie von Cd- und Zn-MT. Da zu erwarten war, dass das Spektrum von Hg-MT gegenüber Cd-MT etwa 50 nm ins Rote verschoben sein würde, erhoffte man sich eine bessere Auflösung der optischen Spektren und damit mehr Einblick in die Natur der Ligand→Metal Charge-Transfer Übergänge (LMCT-Übergänge) von Zn- und Cd-MT.

Ein weiterer Grund war die Einzigartigkeit der zu erwartenden Verbindung. Ist doch Hg-MT der einzige bisher bekannte, wasserlösliche, polynukleäre und tetraedrale Hg(II)-Thiolat-Komplex, eine Verbindung, die ohne die Vermittlung einer die Thiolat-Liganden orientierende Peptidkette wohl kaum herzustellen wäre.

Ein weiterer Anstoß zu diesem Projekt waren die zahlreichen Arbeiten über Hg(II) und MT, die in der biochemischen und toxikologischen Literatur erschienen sind, die aber ein völlig widersprüchliches und unklares Bild ergaben (Sokolowsky et al., 1974; Holt et al., 1980; Szymanska et al., 1983).

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Das verwendete Protein

Alle folgenden Arbeiten wurden mit MT aus Kaninchen-Leber (R-LMT) Isoform 1 oder 2 durchgeführt. Soweit Kenntnis der Aminosäuresequenz erforderlich war, wurde R-LMT-2 verwendet. Um das Protein zu erhalten, wurden Kaninchen in Intervallen von 2-3 Tagen 15 mal je 1 mg CdCl_2 per kg Körpergewicht subkutan injiziert (Kimura et al., 1979). Das Protein wurde nach der Methode von Kägi et al. (1974), leicht modifiziert nach Kimura et al. (1979), isoliert. Die Reinheit jeder Präparation wurde mittels automatischer Aminosäureanalyse und Atomabsorptionsspektrometrie sichergestellt. Das native Protein enthielt 7 Zn- und Cd-Ionen im ungefähren Verhältnis von 2 zu 5 (Gilg, 1985).

3.2 Herstellung von Apo-Metallothionein

Apo-MT wurde hergestellt, indem Lyophilisat des nativen Proteins in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) gelöst und das gleiche Volumen 1 M HCl zugefügt wurde. Die in dieser Lösung frei gewordenen Metallionen wurden sofort über eine mit 10 mM HCl equilibrierte Sephadex G-25 Säule entfernt. Das entsalzte Apo-Protein wurde gepoolt, mit Wasser 1 : 1 verdünnt und lyophilisiert. Auf diese Art und Weise hergestelltes Apo-MT enthielt weder Zn noch Cd in nachweisbaren Mengen. Der Cu-Gehalt schwankte zwischen 0.1-0.2 mol Cu/mol Protein.

3.3 Metallbestimmungen

Bestimmungen von Zn, Cu und Cd wurden mittels Atomabsorption in einer Luft/Acetylen-Flamme durchgeführt. Hg-Lösungen von 100 ppm und höher konnten mit demselben Verfahren bestimmt werden (Apparat: Instrumentation Laboratory IL 157). Um an MT gebundenes Hg zu bestimmen, benötigte man eine grössere Empfindlichkeit, die nur mittels flammenloser Atomabsorption erreichbar war. Auf dem Gerät IL Video 12, ausgerüstet mit einer Ofeneinheit IL 555 und automatischer Probeneinspritzung

Tabelle 3.I: Programm für die Ofeneinheit IL 555 zur Bestimmung von Hg(II) in MT-haltigen Lösungen.

Stufe	1	2	3	4	5*	6
Temperatur (°)	-	125	175	-	1500	-
Zeit (sec)	-	20	10	-	5	-
* Integration:	1.0 sec, Peak-Fläche					
Einspritzzeit	2 - 4 sec					
Inertgas	N ₂ , 6 SCFH					
Arbeitsbereich	0.05 - 0.6 ppm					
Absorptionsmessung	253.7 nm					

(Fastac II), wurde das in Tabelle 3.I dargestellte Programm entwickelt.

Die Bestimmung von Hg ist recht problematisch, da es in der Grafitküvette des Ofens bei niedrigen Temperaturen reduziert wird und deshalb bereits oberhalb 200° merklich verdampft. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wird die Hg enthaltende Probe nie über 200° erhitzt. Zusätzlich wird ein grosser Überschuss ($\times 1000x$) an Cystein allen Standards und Proben zugefügt, um durch die starke Komplexbildung von Hg(II) an Schwefel zu verhindern, dass dieses vorzeitig verdampft. Weiter erreicht man dadurch, dass Standards und Proben sich chemisch gleich verhalten.

Alle Proben wurden mit 1 mM Cystein in 0.1 M HCl auf die in Tabelle 3.I angegebenen Konzentrationen verdünnt. Standards wurden vor jedem

Gebrauch frisch aus einer Lösung $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ in 5 % HNO_3 (2000 ppm, Titrisol, Merck) durch Verdünnung mit 1 mM Cystein in 0.1 M HCl hergestellt. Damit alles Hg als Hg(II) erhalten blieb, wurden alle Lösungen in Glasgefäßen aufbewahrt.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinbestimmung standen drei Methoden zur Verfügung: Die genaueste Bestimmungsmethode für MT ist die automatische Aminosäureanalyse nach Oxidation der Cys zu Cysteinsulfonsäure (CySO_3H) mit Perameisensäure. Dazu wird 1 Teil H_2O_2 (32 % in H_2O) mit 5 Teilen Ameisensäure gemischt und während 2 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Perameisensäure wird zum MT gegeben und 5 h bei 4° inkubiert. Anschliessend wird 14 h unter Luftausschluss in 6 M HCl hydrolisiert. Für die Berechnung der Proteinmenge wurden die Aminosäuren Asparaginsäure, Prolin, Alanin, Isoleucin und Lysin im von Kimura et al. (1979) angegebenen Verhältnis verwendet. Bei dieser Methode betrug die Standardabweichung zwischen 3 und 5 %. Die besten Resultate wurden mit Apo-MT in Abwesenheit von Tris erhalten.

Für rasche Bestimmungen wurde die Absorption bei 220 nm gemessen und die Konzentration mit dem Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{220} = 48'200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Bühler & Kägi, 1979) für Apo-MT in 0.1 M HCl berechnet. Die Genauigkeit der durch diese Methode erhaltenen Werte hängt von der jeweiligen Präparation ab (Gehalt an Cu und Tris). Man erhält, verglichen mit der automatischen Aminosäureanalyse, meistens um 10 - 15 % höhere Werte.

Als dritte Methode wurde DTNB zur Proteinbestimmung herangezogen. Bei der Annahme von 20 freien SH-Gruppen und einem Extinktionskoeffizienten bei 412 nm von $13'600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Glazer et al., 1975; S. 113) für das Reaktionsprodukt in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) erhält man, verglichen mit der automatischen Aminosäureanalyse um etwa 5 - 10 % zu hohe Werte. Diese Methode ist die empfindlichste Bestimmungsmethode für Apo-MT und benötigt 0.5 nmol Protein. Zusätzlich lässt sich damit auch Disulfid nachweisen und quantifizieren. Die DTNB-Methode lässt sich nur auf Apo-MT anwenden, da im Falle des Holo-Proteins in 6 M Guanidin-HCl und 40 mM EDTA gearbeitet

werden muss (Bühler, 1974). In diesem Milieu ist aber der Extinktionskoeffizient bei 412 nm nicht genau bekannt.

3.5 Rekonstitution von Hg-Metallothionein

Zu einer Lösung von Apo-MT in 0.01 M HCl wird bei Raumtemperatur HgCl_2 , ebenfalls in 0.01 M HCl gelöst, in der gewünschten Menge zugegeben. Anschliessend wird das pH mit einer Tris-Lösung langsam und unter starkem Mischen auf 8.6 gebracht. Diese Methode wurde bis zu einer Endkonzentration von 50 μM ($\approx 1/3$ mg/ml) und 30 ml Lösung getestet. Höhere Konzentrationen führen zu Präzipitationen.

Hg_7 -MT kann aus Tris-HCl lyophilisiert werden. Bei Konzentrationen über 50 μM empfiehlt es sich einen 100-fachen molaren Überschuss an KCl zuzufügen, um Präzipitationen zu vermeiden. In phosphathaltigen Puffern und beim Konzentrieren im Ultrafilter präzipitiert Hg_7 -MT ebenfalls.

Hg -MT's mit weniger als 7 mol Hg/mol MT wurden nach derselben Methode hergestellt. Zur Vermeidung der Oxidation von freien Thiolat-Gruppen wurden alle Lösungen entgast und es wurde in einer mit Stickstoff gesülten Glovebox gearbeitet (vergl. 7.2).

$(\text{Hg,Zn})_7$ -MT's, in denen Hg und Zn in allen möglichen Verhältnissen vorkommen, lassen sich mit derselben Methode herstellen. Diese Hybride wurden aber nie in Konzentrationen höher als 12 μM hergestellt.

3.6 UV-, CD- und MCD-Spektroskopie

Alle UV-Spektren zwischen 210 und 400 nm wurden mit Diodenarray-Spektrophotometern (HP 8150 und HP 8451A) aufgenommen. Die maximalen Absorptionen betrugen weniger als 1 OD.

CD- und MCD-Spektren wurden mit einem Spektropolarimeter (Jasco J-500C) aufgenommen, das mit einem Elektromagneten ausgerüstet ist, der eine magnetische Feldstärke von 15'000 Gauss erzeugt. Um das Signal/Rauschen-Verhältnis zu verbessern, wurde 10 bis 20 mal akkumuliert und mit folgendem Algorithmus geglättet:

$$\begin{array}{lcl}
 j=i+3 & & a_{i-3} = a_{i+3} = -2 \\
 y_i = \sum_{j=i-3}^{j=i+3} a_j y_j : 21 & \text{mit} & a_{i-2} = a_{i+2} = 3 \quad a_i = 7 \\
 & & a_{i-1} = a_{i+1} = 6
 \end{array}$$

Die Konzentration der Proben wurde so gewählt, dass die Absorption bei 280 nm ungefähr 0.6 betrug. Das erhaltene Signal Θ (in mdeg) wurden auf molare Elliptizitäten $[\Theta]$ umgerechnet. Im Falle der magnetischen Elliptizitäten $[\Theta]_M$ wurde das Signal auf 1 Gauss normiert.

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times 100}{c \times l} \quad \text{und} \quad [\Theta]_M = \frac{\Theta_M \times 100}{c \times l \times H}$$

wobei c der Konzentration in mol/l, l der Küvettendicke in cm und H der magnetischen Feldstärke in Gauss entspricht.

3.7 Differentielle Modifikation von Hg₇-Metallothionein

Für die differentielle Modifikation wurde Hg₇-MT-2 verwendet. Dabei wurde in einer Stickstoff gespülten Glovebox bei Raumtemperatur gearbeitet, und alle Lösungen wurden vorher entgast (vergl. 7.2). 800 nmol Protein wurden in 16 ml 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.6) mit 2.5 μCi ¹⁴C-Jodacetamid (53 $\mu\text{Ci}\mu\text{mol}^{-1}$) während 2 min inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktionslösung unter Luftausschluss bei 4° gegen 1 l 2 M 2-Mercaptoethanol in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) dialysiert. Nach 24 h wurde der Dialysepuffer gegen 1 l 1 M Mercaptoethanol in 0.1 M HCl ausgewechselt. Bevor das Hg-freie MT mit nichtradioaktivem Jodacetamid vollständig modifiziert wurde, wurde 3 mal gegen 1 l 0.01 M HCl dialysiert. Die Modifikation mit nichtradioaktivem Jodacetamid ist unter 7.4 beschrieben, die darauf folgende tryptische Verdauung, Peptidfraktionierung und die Bestimmung der spezifischen Radioaktivitäten der erhaltenen Peptide unter 7.6 und 7.7 .

3.8 Modifikationen mit DTNB

Für die Modifikation mit DTNB wurden alle Lösungen entgast und mit Stickstoff gesättigt. Kinetische Messungen wurden mit einem Dioden-Array-Spektrophotometer durchgeführt. In der Küvette befand sich ein Rührer. Der Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.6) und ein 12-facher Überschuss an DTNB wurden vorgegeben und unter Rühren wurde die Reaktion durch die Zugabe des Proteins ausgelöst (vergl. 7.3). Die Reaktion wurde bei 412 nm verfolgt ($\epsilon_{412} = 13'600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Glazer et al., 1975; S. 113).

3.9 pH-Abhängigkeit der UV-, CD- und MCD-Spektren

Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit des UV-, CD- und MCD-Spektrums von Hg₇-MT wurde, je nach pH-Bereich, 2 mM Citrat, Phosphat, Tris oder Glycin als Puffer verwendet. Das pH wurde mit 0.1 M HCl oder 0.1 M KOH eingestellt. Zu 3 ml des hergestellten Puffers wurden 15 - 36 nmol Hg₇-MT gegeben, welches unter Luftausschluss (CO₂) gegen 0.2 mM Tris (pH 9.2) dialysiert worden war. Die Referenzlösung wurde hergestellt, indem zu 3 ml des gleichen Puffers das gleiche Volumen an Dialyseflüssigkeit gegeben wurde. Vor der Aufnahme wurde das pH von Probe und Referenz direkt in der Küvette gemessen. UV-, CD- und MCD-Spektrum wurden von derselben Lösung aufgenommen.

3.10 Potentiometrische Titration von Hg₇-Metallothionein

Apparatur, Eichung

Als Titrationsapparatur diente ein schreibendes Titriersystem von Radiometer, bestehend aus folgenden Komponenten:

pH-Meter	PHM 64	Autobürette	ABU 12
Titратор	TTT 60	Titrierstand	TTA 60
Schreiber	REC 61		

Zur pH-Messung wurden eine Glaselektrode (G 2040C) und eine Kalomel-Elektrode (K 4040) von Radiometer verwendet. Der Titrand wurde aus einer 0.25 ml Bürette über eine Glasauslaufspitze (D 4346, Radiometer) zur gerührten Lösung gegeben. Das Vorratsgefäß sowie das Titriergefäß wurden mit Stickstoff gespült.

Das pH-Meter wurde bei pH 1.69, 4.01, 7.01 und 10.01 mit den entsprechenden Eichpuffern (Radiometer) auf ± 0.02 pH-Einheiten geeicht. Das Potential an der Elektrode war über den ganzen gemessenen pH-Bereich proportional zum pH der Eichpuffer. Die Potentialdifferenz pro pH-Einheit betrug 97 % der theoretisch berechneten.

Lösungen, Titration

Alle Lösungen wurden mit karbonatfreiem Wasser hergestellt. Zu diesem Zweck wurde bidestilliertes Wasser während 10 min gekocht und siedend in Glasflaschen abgefüllt. Das pH des gekochten Wassers betrug 7.8. Folgende Stammlösungen wurden mit karbonatfreiem Wasser hergestellt: 1M Tris, 3M KCl, 2M KOH (Titrisol, Merck) und 2M HCl (Titrisol, Merck). Mit diesen Stammlösungen wurden alle verwendeten Lösungen hergestellt.

Für die potentiometrische Titration wurde Hg₇-MT-1 verwendet. Um von genau vorgegebenen Ausgangsbedingungen ausgehen zu können, wurden etwa 40 mg Protein in 2 ml 0.5 mM Tris/500 mM KCl (pH 9.5) gelöst und über Nacht bei 4° gegen 1l 0.2 mM Tris/200 mM KCl (pH 9.2) unter Luftausschluss in Anwesenheit von N₂ dialysiert.

Das Dialysat wurde in einer mit Stickstoff gespülten Glovebox in Eppendorfröhrchen (je 1.5 ml) abgefüllt und mit einer Eppendorfszentrifuge ausgefallenes Protein abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels automatischer Aminosäureanalyse bestimmt. Der jeweils verwendete Wert wurde aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Messungen gebildet. Alle Proteinlösungen hatten eine Konzentration von etwa 13 mg/ml (≈ 2.1 mM).

Die Titration erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Dialyseflüssigkeit titriert und im zweiten die dialysierte Proteinlösung,

wobei, falls mit 0.2 M KOH begonnen wurde, zuerst nach pH 12 und mit 0.2 M HCl von pH 12 nach pH 2 und wieder nach pH 12 titriert wurde. Entsprechend wurde, falls die Titration mit 0.2 M HCl begonnen wurde, zuerst nach pH 2 und darauf nach pH 12 und wieder nach pH 2 titriert. Während der Titration wurde das pH als Funktion des verbrauchten Titranten aufgezeichnet und die Geschwindigkeit der Titrantenzugabe wurde der Geschwindigkeit der pH-Änderung angepasst, wobei die Titration von pH 2 bis pH 12 oder umgekehrt etwa 20 min dauerte.

Korrekturen, Auswertung

Bei der Titration von Hg-MT mit Base oder Säure wird ein Teil der Protonen (oder Hydroxylionen) für die Protonierung (Deprotonierung) von Puffer oder Verunreinigungen benötigt. Bei hohem oder tiefem pH braucht es zudem beträchtliche Mengen von Protonen resp. Hydroxylionen um das jeweilige pH einzustellen. Um beide Korrekturen zu erhalten, wurde das zu titrierende Hg₇-MT gegen 0.2 mM Tris (pH 9.2) dialysiert (vergl. Lösungen, Titration), und das Dialysat als Referenz verwendet. Probe und Referenz wurden unter gleichen Bedingungen, in verschiedenen Experimenten, unabhängig voneinander in der genau gleichen Art und Weise titriert. Zwischen pH 5 und 9 können bei der Titration mit Säure und Base die Protonen (resp. Hydroxylionen), die zum Aufbau des Pools an freien H⁺ und OH⁻ benötigt werden, vernachlässigt werden, da sie weniger als 0.1 % einer ionisierbaren Gruppe ausmachen.

Wären die Volumina von Probe und Referenz über den ganzen Bereich dieselben, so könnte der Bedarf an Säure (Base) für die Referenz von demjenigen der Probe abgezählt werden, um die Menge der Protonen für die Titration der ionisierbaren Gruppen des Proteins zu erhalten. Für Berechnung der Anzahl der titrierten Gruppen des Proteins (r) kann also folgende Formel angewandt werden:

$$r = \frac{m_p - m_r}{m_i}$$

wobei m_p und m_r der Menge der zugeführten H^+ bzw. OH^- (in nmol) für Probe und Referenz und m_i der Proteinmenge der Probe (in nmol) entsprechen.

Die Referenz enthält kein Protein, deshalb muss ihr weniger Säure (Base) zugefügt werden, um ein bestimmtes pH zu erreichen, als der Probe. Aus diesem Grund entsteht zwischen Referenz und Probe eine Volumendifferenz, die bei hohem und tiefem pH zu einem unterschiedlichen Verbrauch an Säure oder Base führt, der korrigiert werden muss. Da die Menge an freien H^+ resp. OH^- aber proportional dem Volumen ist, wurde folgende Formel verwendet:

$$r = \frac{m_p - m_r \cdot (V_p/V_r)}{m_i}$$

wobei V_p und V_r die Volumen von Probe und Referenz darstellen.

3.11 Ladungsbestimmung von Hg₇-Metallothionein

Die Ladung von Hg₇-MT wurde mittels Stärkegel-Elektrophorese bestimmt (Poulik, 1957). Das Stärkegel wurde aus 35 g Stärke und 350 ml Gelpuffer (76 mM Tris-5 mM Citrat, pH 8.65) hergestellt. Dazu wurde die Stärke im kalten Gelpuffer suspendiert und unter starkem Schütteln aufgekocht bis das Gemisch viskös und durchsichtig erschien. Das heiße Gel wurde sofort am Wasserstrahlvakuum entgast und in die Form gegossen (25/15/1 cm). Vor Austrocknung geschützt wurde das Gel bis zum nächsten Tag bei 4° gelagert.

Pro Probe wurden 40 µg MT auf ein Stück Fliesspapier (Whatman 3) gegeben und sorgfältig in das Gel gesteckt. Die Elektrophorese fand bei 4° und 70 - 100 mA ($\approx$ 250 - 300 V) in der Breite des Gels statt. Die Kontakte zwischen Gel- und Wannepuffer (0.3 M Borsäure-NaOH, pH 8.1) wurden durch saugfähiges Papier hergestellt. Um während der Elektrophorese das Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde es mit Plastikfolie abgedeckt.

Nach 2.5 - 3 h Elektrophorese wurde das Gel in der Mitte auseinander geschnitten und die beiden Teile mit Coomassie brilliant blue (Bradford, 1976) während 5 min gefärbt. Anschliessend wurde mit Methanol/Essigsäure/H₂O = 1/1/12 während 24 h entfärbt.

3.12 Bestimmung des Stokes' Radius

Die Bestimmung des Stokes' Radius erfolgte auf Grund des Verteilungskoeffizienten (K_D) der Chromatographie von Referenzproteinen (Figur 4, IX; Tabelle 4.X), und von Hg₇-MT und Hg₁₀-MT über Sephadex G-75 in 20 mM Tris-HCl (4°, pH 8.6) (Kägi et al., 1974). Die Säule hatte einen Durchmesser von 0.9 cm und eine Länge von 150 cm. Es wurden jeweils 0.5 ml Lösung aufgetragen und mit 13 ml/h eluiert. Als Elutionsvolumen (V_e) jeder Probe wurde das Volumen genommen, das bis und mit der Peak-Fraktion der jeweiligen Probe gesammelt wurde. Der K_D wurde folgendermassen berechnet:

$$K_D = \frac{V_s - V_e}{V_s - V_o}$$

Das Ausschlussvolumen (V_o) wurde mit Dextranblau und das Salzvolumen (V_s) mit KI bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass Proteine nicht zusammen mit Dextranblau chromatographiert wurden (Interaktionen).

Für die Bestimmung der Abhängigkeit des Stokes' Radius von der Ionenstärke wurden die Proben unter denselben Bedingungen über dieselbe Säule eluiert. Als Elutionspuffer wurde 5 mM Tris-HCl (pH 8.6) verwendet. Die Ionenstärke wurde mit KCl variiert.

4. RESULTATE

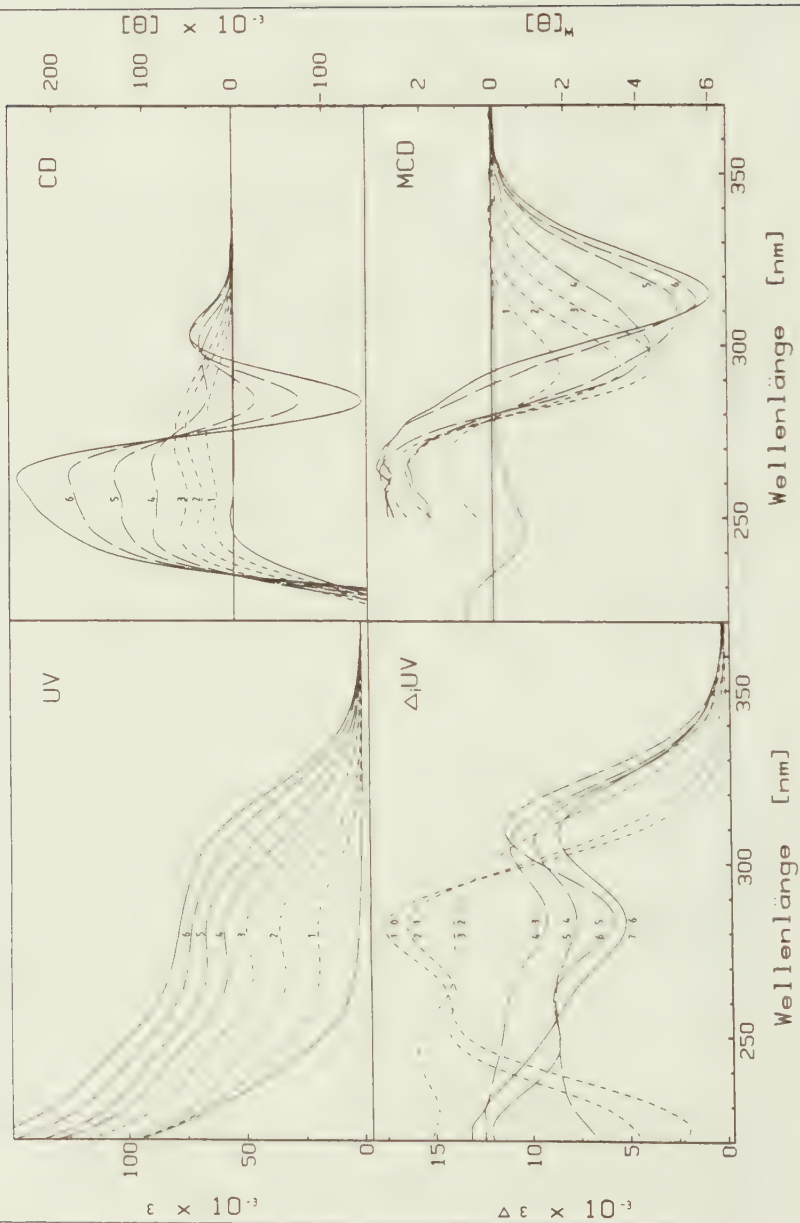
4.1 Die Bindung von Hg(II) an Metallothionein

Wegen der hohen Affinität von Hg(II) für Thiolat-Gruppen binden diese im Unterschied zu Zn(II) und Cd(II) in wässriger Lösung auch bei stark saurem pH an die Cys von Metallothionein (MT). Bei neutralem pH kann das native Protein schon durch Zugabe von kleinen Mengen HgCl_2 ausgefällt werden und für MT's mit mehr als 7 gebundenen Hg(II) sind bei diesem pH keine Bedingungen gefunden worden, bei denen diese während mehr als einigen Stunden stabil sind. Um zu reproduzierbaren Hg-MT's zu gelangen, ist es deshalb notwendig, Hg(II) bei pH 2 mit Apo-MT zu mischen und die Lösung anschliessend mit Tris auf 8.6 zu bringen. Die einzige bei neutralem pH stabile Form ist $\text{Hg}_7\text{-MT}$. MT's mit weniger gebundenem Hg(II) werden durch Luftsauerstoff oxidiert, während solche mit mehr als 7 gebundenen Hg(II), je nach Konzentration, Ionenstärke und Temperatur, mehr oder weniger rasch präzipitieren. Bei höheren Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ ist es in jedem Fall notwendig, einen etwa 100-fachen, molaren Überschuss an KCl beizufügen, um die Präzipitation des Proteins zu vermeiden.

Tabelle 4.I: Eigenschaften von $\text{Hg}_7\text{-Metallothionein}$.

		vergl. Kap.
Molekulargewicht	7500	
ϵ_{280}	$80'000 \pm 2000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	4.2
Ladung $\text{Hg(II)}_7\text{-MT-1}$	-2 e	4.5
Stokes' Radius	14.7 Å	4.6
Isoelektrischer Punkt	5.6 ± 0.1	4.9
pK_d	≈ 30	2.2

Wird Hg(II) bei neutralem pH zu nativem Zn- und Cd-haltigem MT gegeben, findet man zuerst eine Zunahme der Absorption bei 280 nm, bei weiterer Zugabe nimmt die Absorption wieder ab, meist begleitet von der Präzipita-



tion des Proteins. Dieser Äquivalenzpunkt liegt je nach den gewählten Bedingungen zwischen 5 und 8 mol Hg/mol MT (Bernhard, 1982; Stillman et al., 1983). Produkte, die man so erhält, haben keine reproduzierbare Metallzusammensetzung und sind meist auch nicht stabil. Die für Hg-MT charakteristische Absorptionsschulter bei 280 nm (Figur 4.II) ist bei diesen Formen bedeutend weniger ausgeprägt und deren Intensität ($\epsilon \approx 30'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), wie auch deren genaue Lage sind von den gewählten Bedingungen abhängig und deshalb auch kaum reproduzierbar.

Erfolgte nach der Zugabe von 7 mol Hg/mol MT zu nativem $(\text{Cd,Zn})_7\text{-MT}$ eine Behandlung mit chelierenden Substanzen (EDTA, Chelex) so führte dies nicht zu einem reproduzierbaren und stabilen Produkt. Mit dieser Behandlung wurden zwar alles Zn(II) , nicht aber alles Cd(II) entfernt, d.h. trotz der viel höheren Affinität von Hg(II) verdrängt dieses Cd(II) nur partiell vom nativen MT, und die erhaltenen Formen hatten zwischen 8 und 9 Metallionen gebunden (1 - 2 mol Cd, 7 mol Hg) und präzipitierten innerhalb einiger Stunden. Auch die Zugabe von HgCl_2 zu Apo-MT bei neutralem pH führte nicht zu einem stabilen Produkt, da auf Grund der hohen Affinität von Hg(II) für die Cys die Bindung nicht spezifisch erfolgte und das Protein ausfiel.

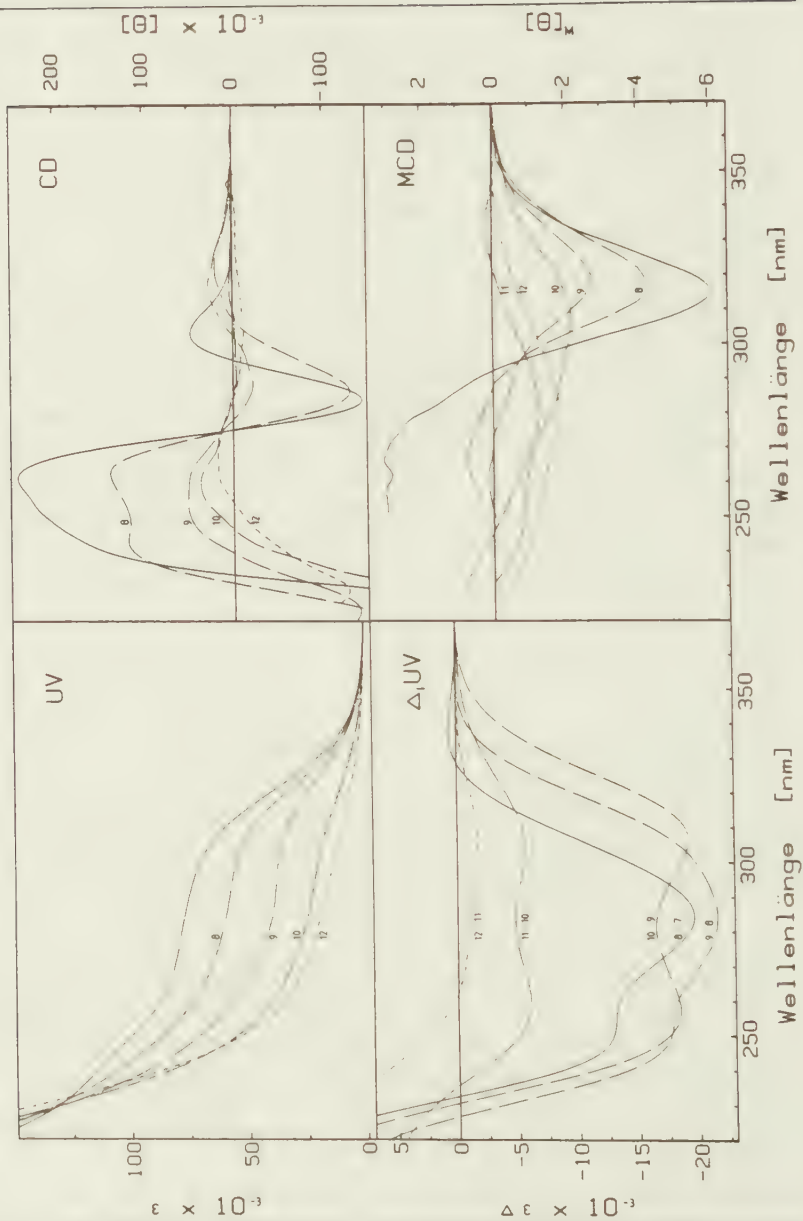
4.2 Optische Spektroskopie von Hg-Metallothionein

Wird HgCl_2 bei pH 2 zu Apo-MT gegeben und das pH langsam mit Tris auf 8.6 gebracht (vergl. 3.5), so zeigt das erhaltene Hg-MT eine Absorptionsschulter bei 280 nm, wo Apo-MT nicht absorbiert. In Figur 4.II werden

Figur 4.II: UV-, CD-, MCD-Spektren, sowie UV-Inkrement-Differenzspektren von Apo- und $\text{Hg}_1\text{-}$ bis $\text{Hg}_7\text{-MT}$. Auffällig sind Formänderungen sowie Rotverschiebung der Spektren bei den Formen mit mehr als 3 mol Hg/mol MT. Die Zahlen geben den Hg-Gehalt der entsprechenden Spezies an.

(—) Apo-MT, $\text{Hg}_7\text{-MT}$; (-----) $\text{Hg}_1\text{-}$ bis $\text{Hg}_3\text{-MT}$; (— · — · —) $\text{Hg}_4\text{-}$ bis $\text{Hg}_6\text{-MT}$.

ϵ , $\Delta\epsilon$ in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $[\theta]$ in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, $[\theta]_M$ in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \text{ Gauss}^{-1}$



UV-, CD-, MCD-Spektren sowie die UV-Inkrement-Differenzspektren (Differenz zweier aufeinander folgender UV-Spektren, $\Delta_1 \text{UV}$), nach Zugabe von jeweils 1 bis 7 mol Hg/mol MT dargestellt. Dabei fällt auf, dass sich Form und Intensitätszunahme bei den entsprechenden Spektren in allen drei Spektroskopiearten nach 3 mol zugegebenen Hg/mol MT ändern. Besonders eindrücklich ist diese Änderung in den CD-Spektren zu sehen, wo mit 4 mol Hg/mol MT das Spektrum eine völlig andere Form annimmt, was auf eine Reorganisation der Hg-Komplexe hindeutet.

Diese Formänderung ist in den UV-Spektren weniger stark ausgeprägt. Um sie deutlicher sichtbar zu machen, wurden Inkrement-Differenzspektren ($\Delta_1 \text{UV}$) berechnet, in denen Änderungen der Form und der Intensitätszunahme besser sichtbar sind. Für die ersten 2 zugefügten mol Hg/mol MT ist die Extinktionszunahme pro Hg bei 280 nm am grössten und entspricht, bezogen auf ein Hg, einem Differenz-Extinktionskoeffizienten von etwa $17 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. An der Position dieses Differenz-Maximums erscheint auch in den UV-Spektren von Hg_1 - bis Hg_4 -MT ein Absorptionsmaximum. Vom dritten bis zum siebten mol Hg/mol MT verschiebt sich das Differenz-Absorptionsprofil nach niedrigerer Energie, wobei bei 280 nm ein Differenz-Minimum und bei 310 nm ein neues Differenz-Maximum entsteht. Damit verbunden ist eine kontinuierliche Abnahme des Absorptionszuwachses. Diese Änderungen manifestieren eine Rotverschiebung der UV-Absorptions-Envelope und eine deutlich abflachende Intensitätszunahme mit zunehmendem Hg-Gehalt.

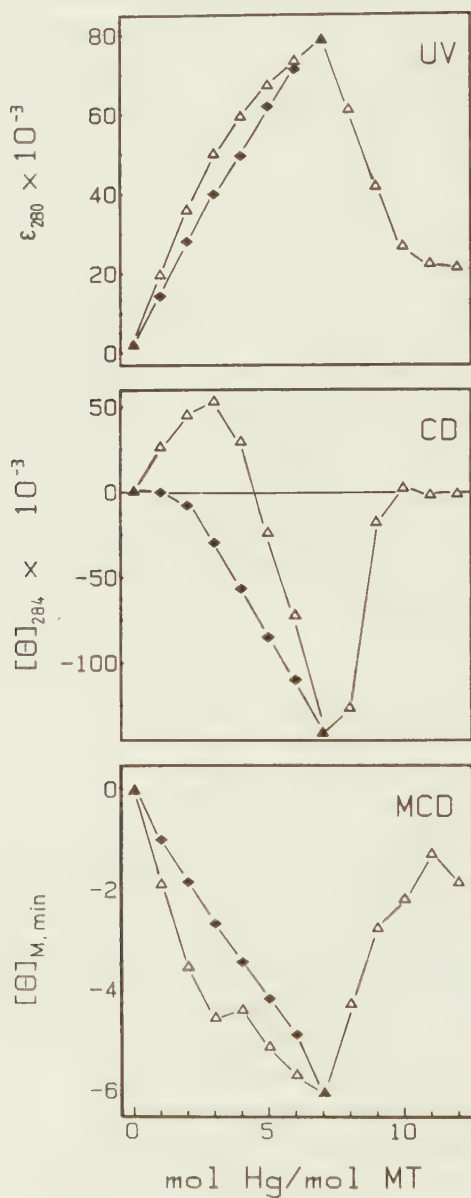
Figur 4.III: UV-, CD-, MCD-Spektren, sowie UV-Inkrement-Differenzspektren vom Apo- und Hg_7 - bis Hg_{12} -MT. Zugabe von mehr als 7 mol Hg/mol MT führt zur Abnahme der Absorptionsschulter im Spektrum von Hg-MT. Die Änderung der Form der Spektren zwischen 10 und 11 mol Hg/mol MT deutet darauf hin, dass eine neue Spezies mit einem Hg/Cys-Verhältnis von 2 gebildet wird.

Die Zahlen geben den Hg-Gehalt der entsprechenden Spezies an.

(—) Hg_7 -MT; (— · — ·) Hg_8 - bis Hg_{11} -MT; (----) Hg_{12} -MT;

(.....) UV-Spektrum von Hg-MT mit 20 mol Hg/mol MT.

ϵ , $\Delta\epsilon$ in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $[\theta]$ in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$; $[\theta]_M$ in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \text{ Gauss}^{-1}$



- ▲ Hg_7 -MT, Apo-MT
 △ Hg_1 - bis Hg_6 -MT
 ◇ $(Hg,Zn)_7$ -MT

Figur 4.IV: Änderung von ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$), $[\Theta]_{284}$ ($degcm^2 dmol^{-1}$) und $[\Theta]_{Mmin}$ ($degcm^2 dmol^{-1} Gauss^{-1}$) in Abhängigkeit des Hg-Gehaltes in Hg -MT und $(Hg,Zn)_7$ -MT. Die Veränderungen der optischen Spektren in den $(Hg,Zn)_7$ -Hybriden verlaufen mit zunehmendem Hg-Gehalt stetiger, wogegen bei den nur Hg enthaltenden MT's deutliche Zäsuren bei 3, 7 und 10 resp. 11 mol Hg/mol MT auftreten.

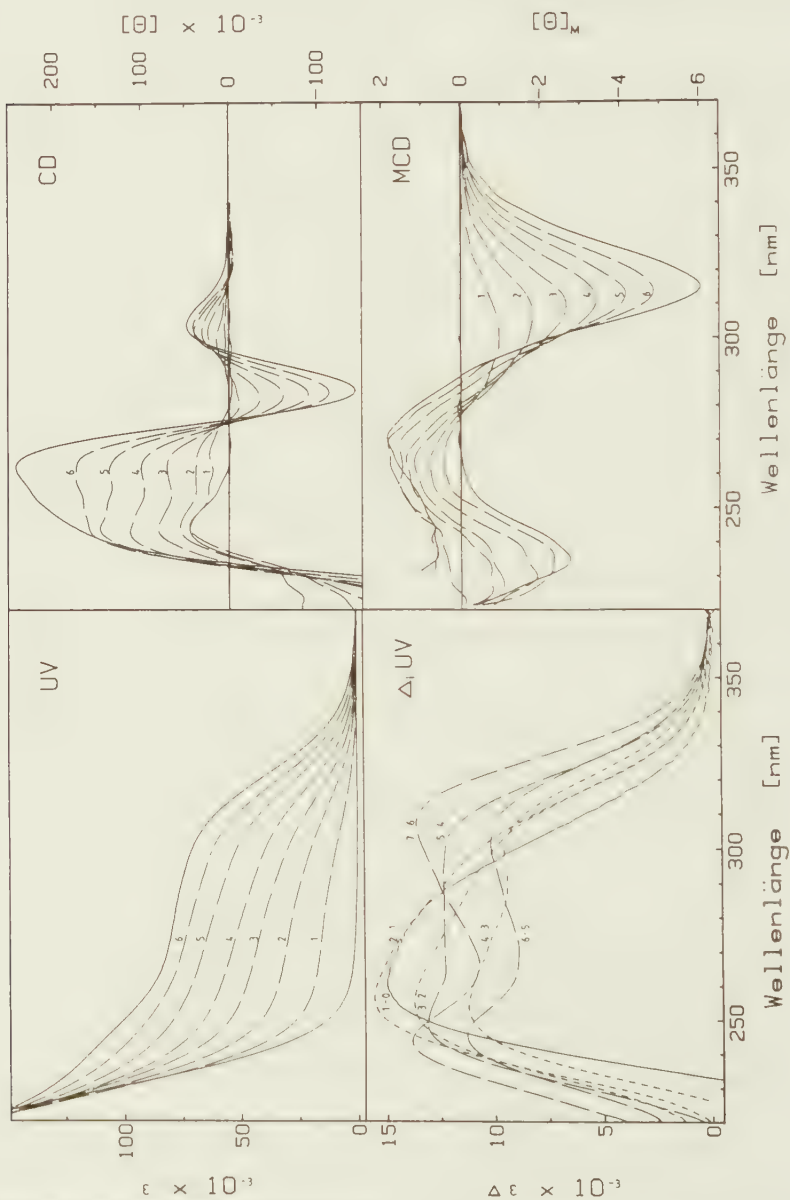
Grosse Verschiebungen gegen niedrigere Energien sind auch in den MCD-Spektren zu sehen. Hier ist vor allem interessant, dass die Verschiebung des Minimums bei 290 nm erst mit 4 mol Hg/mol MT eintritt und dass die grösste Verschiebung zwischen Hg_4^- und Hg_5^- -MT erfolgt. Parallel zur Rotverschiebung des MCD-Spektrums nehmen von Hg_3^- zu Hg_4^- -MT die Amplituden des ganzen Spektrums ab (Figur 4.V). Dieser Effekt ist bei 270 nm besonders ausgeprägt, wo der Intensitätsverlust etwa ein Drittel des Signals ausmacht. Bei weiterer Zugabe von Hg wächst die Amplitude bei 270 nm wieder, bleibt aber zwischen 5 - 7 mol Hg/per mol MT konstant, während die negative Amplitude monoton mit der Hg-Zugabe wächst. Dies führt dazu, dass die nahezu symmetrischen biphasischen Spektren von Hg_1^- und Hg_2^- -MT mit zunehmendem Hg-Gehalt stark asymmetrisch werden.

Mit 6.9 ± 0.2 mol Hg/mol MT erreicht die Absorptionsschulter bei 280 nm ihre grösste Intensität und nimmt beim Überschreiten dieses Verhältnisses rasch ab (Figur 4.III und 4.IV). Diese Abnahme der Signalintensität ist auch in den CD- und MCD-Spektren zu sehen. Zusätzlich zeigt sich in diesen zwei Spektroskopiearten eine Rotverschiebung, die besonders in den CD-Spektren deutlich sichtbar ist. Hier ist auch auffällig, dass das Signal bei 285 nm zwischen 8 und 9 mol Hg/mol MT sehr stark abnimmt, bei etwa 11 mol Hg/mol MT fast verschwindet, um mit 12 mol Hg/mol MT wieder leicht zu erscheinen.

Diese Änderungen finden ebenfalls ihren Ausdruck im MCD-Spektrum, wo zwischen 7 und 8 mol Hg/mol MT das Signal bei 270 nm fast vollständig verschwindet und zwischen 9 und 11 mol Hg/mol MT eine Verschiebung gegen höhere Energien stattfindet. Mit mehr als 11 gebundenen Hg-Ionen pro Proteinkette nimmt das Signal wieder zu.

Um auch hier die Änderungen zwischen den einzelnen UV-Spektren deutlicher hervorzuheben sind UV-Inkrement-Differenzspektren ermittelt worden. Beim Vergleichen derselben mit den Differenzspektren in Figur 4.II fällt auf, dass die Form des Differenzspektrums zwischen 7 und 8 mol Hg/mol MT dieselbe ist, wie diejenige zwischen 1 und 2 mol Hg/mol MT mit vertauschtem Vorzeichen, während in den folgenden Differenzen die Abnahme im roten Bereich der Absorptionsschulter stärker zum Vorschein kommt.

Auffällig ist, dass bei allen drei optischen Spektroskopiearten nach 3, 7 und 11 mol Hg/mol MT eine Änderung der Form und/oder im Vorzeichen der



Amplitudenzunahme eintritt (Figur 4.IV). Besonders deutlich ist dies aber bei 7 mol Hg/mol MT zu sehen. Zusammen mit der Beobachtung, dass nur diese Spezies stabil ist, wird im Folgenden angenommen, dass Apo-MT mit 7 mol Hg/mol MT einen Komplex bildet.

4.3 Optische Spektroskopie von $(\text{Hg,Zn})_7$ -Metallothionein

Im Gegensatz zu Hg_1 - bis Hg_6 -MT sind die gemischt rekonstituierten $(\text{Hg,Zn})_7$ -MT's stabile Spezies, in denen alle Bindungsstellen besetzt sind, was bedeutet, dass die Metallionen so koordiniert sind wie im vollständig und homogen besetzten MT. Da die Absorption der Zn-Thiolat-Komplexe von MT über 260 nm sehr klein ist, ergibt sich mit diesen Metall-Hybriden die Möglichkeit, die optische Spektroskopie der Hg-Thiolat-Chromophoren in vollständig besetztem MT zu studieren.

In Figur 4.V sind wie in Figur 4.II UV-, CD-, MCD-Spektren sowie die Inkrement-Differenzspektren ($\Delta_i\text{UV}$) von Zn_7 -, den ganzzahligen Kombinationen von $(\text{Hg,Zn})_7$ - und von Hg_7 -MT aufgezeichnet. Werden diese beiden Darstellungen miteinander verglichen, so fallen vor allem die sehr unterschiedlichen CD-Spektren auf. Im Gegensatz zu den partiell rekonstituierten Hg-MT's zeigen diejenigen der Hg,Zn-Hybride mit zunehmendem Hg-Gehalt nur eine monotone Änderung der Form. Sogar das CD-Spektrum von $(\text{Hg}_1,\text{Zn}_6)$ -MT zeigt ein Signal bei 305 nm, ohne eine negative Bande bei

Figur 4.V: UV-, CD-, MCD-Spektren, sowie UV-Inkrement-Differenzspektren von Zn_7 -, Hg_7 -MT, sowie aller ganzzahligen Kombinationen von $(\text{Hg,Zn})_7$ -MT. Im Gegensatz zu den Proben in Figur 4.II handelt es sich bei diesen immer um vollbesetzte Proteine. Auffällig ist, dass in diesem Fall die Änderungen in der Spektrenform mit Zunahme des Hg-Gehaltes viel weniger auffällig sind und dass die Rotverschiebung kleiner ist.

Die Zahlen geben den Hg-Gehalt der entsprechenden Spezies an.

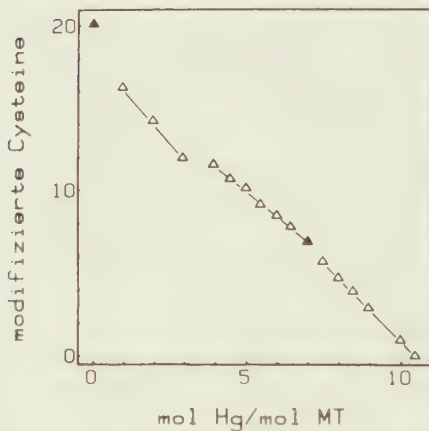
(—) Hg_7 -MT, Zn_7 -MT; (— · — ·) $(\text{Hg}_1,\text{Zn}_6)$ - bis $(\text{Hg}_6,\text{Zn}_1)$ -MT;

(- - - - -) $\Delta_i\text{UV}$ $(\text{Hg}_2,\text{Zn}_5)$ - bis $(\text{Hg}_4,\text{Zn}_3)$ -MT

ϵ , $\Delta\epsilon$ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[\theta]$ in $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$, $[\theta]_M$ in $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}\text{Gauss}^{-1}$

280 nm. Ab 2 mol Hg/mol MT bleibt die Form des Spektrums über 260 nm konstant, die beiden langwelligsten Banden verschieben sich aber von 280 nm und 299 nm in $(\text{Hg}_7, \text{Zn}_6)$ -MT nach 284 nm und 303 nm.

Die auffälligsten Unterschiede in den UV-Absorptionsspektren der Hybrid-MT's gegenüber den ausschliesslich mit Hg partiell rekonstituierten MT's, ist das Fehlen eines Maximums bei 280 nm sowie das proportionale Anwachsen der Intensität mit zunehmendem Hg-Gehalt (Figur 4.IV). Vergleicht man die UV-Inkrement-Differenzspektren, in denen die Unterschiede in der Form deutlicher zum Ausdruck kommen, zeigt sich, dass auch bei diesen Spezies mit zunehmendem Hg-Gehalt das Wachstum vermehrt im roten Bereich der Absorptionsschulter erfolgt. Dies bedeutet, dass sich auch bei den Hg,Zn-Hybriden die Absorptionsschulter gegen niedrigere Energien ausdehnt, aber, verglichen mit nur Hg-haltigen MT's, bedeutend



Figur 4.VI: Mit DTNB modifizierbare Cys in Abhängigkeit vom Hg-Gehalt der Präparation. Bei 3 und 4 mol Hg/mol MT sind etwa gleich viele Cys geschützt. In Hg_7 -MT reagieren noch 7 mol Cys/mol MT mit DTNB und mit 10.5 mol Hg/mol MT sind keine Cys mehr modifizierbar.

▲ Apo-MT, Hg_7 -MT.

weniger stark.

Die unterschiedlich starke Rotverschiebung kommt auch in den MCD-Spektren zum Ausdruck, dabei ist im Gegensatz zu den nur Hg-haltigen Formen diese Verschiebung über alle Spektren verteilt und die Zunahme der negativen Amplitude beinahe proportional zum Hg-Gehalt (Figur 4.IV).

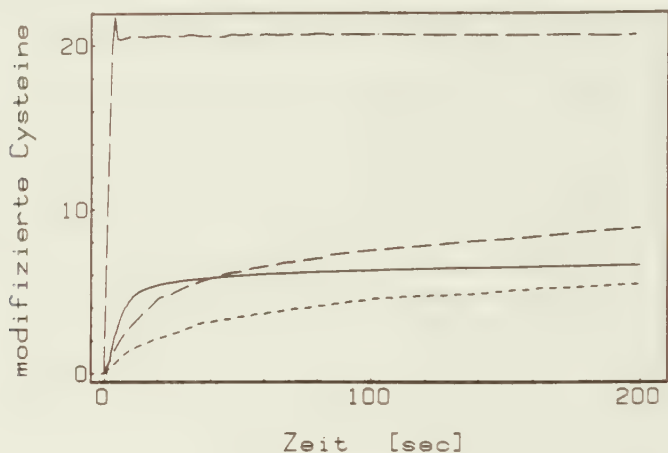
Bemerkenswert ist auch, dass das Verhältnis der positiven (260 nm) zur negativen Amplitude (295 - 315 nm) von $(\text{Hg}_1, \text{Zn}_6)\text{-MT}$ bis $\text{Hg}_7\text{-MT}$ etwa gleich bleibt.

Werden die Amplituden der Spektren aller drei Spektroskopiearten bei bestimmten Wellenlängen gegen den Gehalt an Hg-Ionen aufgetragen (Figur 4.IV), werden die Unterschiede zwischen den Hg_1, Zn_6 -Hybriden und mit Hg partiell rekonstituierten Spezies besonders deutlich sichtbar. Vor allem die Veränderungen zwischen 3 und 4 mol Hg/mol MT fallen bei den Hybriden weg. Die Amplitude nimmt monoton mit nur sehr geringfügigen Änderungen in der Form der aufeinander folgenden Spektren zu.

4.4 Modifikation von Hg-Metalllothionein mit DTNB

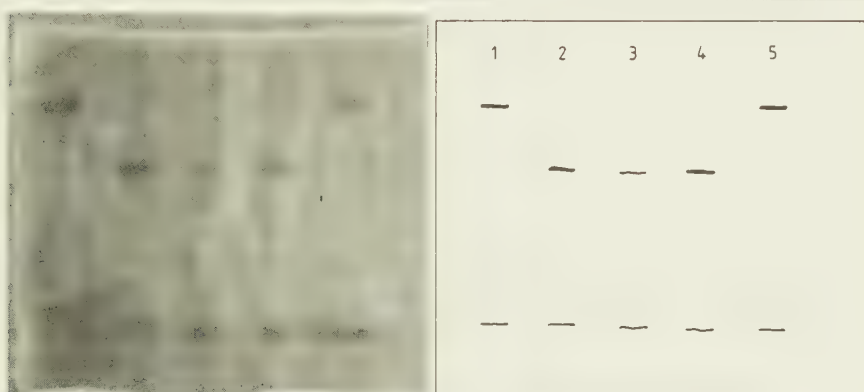
Wird zu MT mit zunehmendem Hg-Gehalt ein 12-facher Überschuss an DTNB gegeben, so reagieren, im Gegensatz zu Zn- und Cd-MT , nicht alle Cys mit dem zugegebenen Reagens. Die Anzahl der durch die Hg-Ionen geschützten Cys hängt jedoch nicht linear vom Hg-Gehalt der jeweiligen MT's ab. So schützt das erste zugegebene Hg-Ion 4 Cys, die folgenden beiden je zusätzliche 2. Zwischen $\text{Hg}_3\text{-}$ und $\text{Hg}_4\text{-MT}$ stagniert die Anzahl der geschützten Thiolat-Gruppen und von $\text{Hg}_4\text{-}$ bis $\text{Hg}_7\text{-MT}$ verhindert jedes weitere zugefügte Hg-Ion die Modifikation von zusätzlichen 1.5 Cys mit DTNB. Wird 7 mol Hg/mol MT überschritten, so werden pro weiter zugegebenem Hg-Ion je 2 Cys weniger modifizierbar. Sind mit 7 mol Hg/mol MT noch 7 Cys reaktiv, so sind nach Zugabe von 10.5 mol Hg/mol MT keine mehr modifizierbar.

Die Modifizierbarkeit der Cys in Abhängigkeit von der Stöchiometrie zeigt parallel zu den optischen Spektren Zäsuren bei 3, 7 und etwa 10 mol Hg/mol MT. Die nahezu gleiche Anzahl reaktiver Cys bei 3 und 4 mol Hg/mol MT zeigt deutlich, dass zwischen diesen Verhältnissen eine Neuorganisation in der Verteilung der Hg-Ionen stattgefunden hat, denn die Anzahl der geschützten Cys kann nur konstant bleiben, wenn zwischen $\text{Hg}_3\text{-}$ und $\text{Hg}_4\text{-MT}$ die Zahl der Metall-Bindungsstellen durch die Umwandlung von terminalen Liganden in Brückenliganden erhöht wird, und in gleicher Weise kann die Abnahme der modifizierbaren Cys um 1.5 Reste pro zusätzlich gebundenes Hg erklärt werden.



Figur 4.VII: Kinetik der Modifikation von (— · — · —) Apo-MT, (-----) Zn₇-MT; (---) Cd₇-MT und (—) Hg₇-MT mit einem 12-fachen Überschuss an DTNB über die Cys von MT. In den ersten 3 Formen reagieren alle 20 Cys von MT, in Hg₇-MT hingegen nur 7. Die Anfangsgeschwindigkeit nimmt von Zn₇-MT über Cd₇-MT zu Hg₇-MT deutlich zu.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Modifikation von Hg₇-MT mit demjenigen von Zn₇- und Cd₇-MT so sieht man, dass die Anfangsgeschwindigkeit bei Hg₇-MT deutlich höher ist als bei den ersteren. Trotz einem 12-fachen Überschuss an DTNB über die Cys-Reste von MT erhält man in keinem der drei Fälle eine Reaktion pseudo-erster Ordnung, wie zu erwarten wäre. So reagiert Hg₇-MT in einer Reaktion höherer Ordnung, in deren Verlauf 5 Cys sofort und die letzten beiden innert 10 und 70 sec reagieren.



Figur 4.VIII: Stärkegel-Elektrophorese von Hg_7 -MT-1, MT-1B aus Pferdenerien (E-KMT-1B), menschlichem MT-2 (H-LMT-2) und nativem Kaninchen MT-1 (R-LMT-1). Die Laufweite des jeweiligen MT's ist proportional zur Ladung. Hg_7 -MT-1 besitzt dieselbe Ladung wie Pferde-MT-1B welche von Bethune et al. (1979) bei pH 8.6 als $-2 e$ bestimmt wurde.

1) H-LMT-2; 2) E-KMT-1B; 3) Hg_7 -MT; 4) R-LMT-1 nativ; 5) H-LMT-2.

4.5 Ladung von Hg_7 -Metallothionein

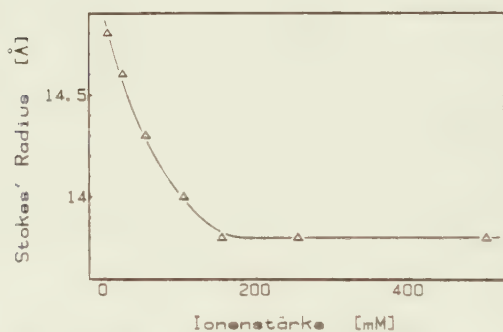
Die Ladung von Hg_7 -MT-1 wurde mittels Stärkegel-Elektrophorese bei pH 8.6 bestimmt. Als Vergleich wurde natives MT-1B aus Pferdenerien (E-KMT-1B) verwendet (Figur 4.VIII). Hg_7 -MT zeigte dieselbe Laufweite gegen die Anode wie natives R-LMT-1 und E-KMT-1B, bewegte sich aber einen Drittel weniger weit als menschliches MT-2 (H-LMT-2). E-KMT-1B trägt zwischen pH 7.5 und 9.5 eine Ladung von $-2 e$ (Bethune et al., 1979) und H-LMT-2 besitzt auf Grund seiner Sequenz und seines Gehaltes von 7 Zn-Ionen (Kissling et al., 1979) eine Ladung von $-3 e$.

Aus diesem Vergleich darf man schliessen, dass die Koordinationsverhältnisse zumindest bezüglich der Stöchiometrie von Metall zu Cys in Hg_7 -MT und nativem $(Cd,Zn)_7$ -MT identisch sind, dass also keine Disulfidbrücken vorliegen. Dies ist nur möglich, wenn sich die Hg-Ionen bei tiefem pH

gleichmässig über die Proteinmoleküle verteilen, was den Austausch von Hg-Ionen zwischen diesen voraussetzt.

4.6 Stokes' Radien von Hg_7^- und Hg_{10} -Metallothionein

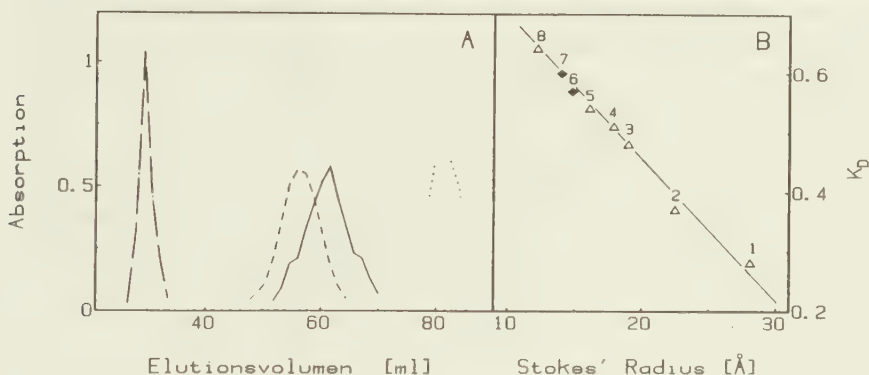
Bei der Gelfiltration über Sephadex G-75 eluieren natives $(\text{Zn,Cd})_7\text{-MT}$, sowie Apo-MT mit einem Verteilungskoeffizienten (K_D) von 0.52, was einem apparenten Molekulargewicht (M_r) von etwa 11'000 entspricht, einem Wert, der um das 1.7-fache über dem aus der Zusammensetzung bestimmten Wert



Figur 4.IX: *Abhängigkeit des Stokes' Radius von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ von der Ionenstärke. Die Änderung des Stokes' Radius mit der Ionenstärke findet bei $\text{Hg}_7\text{-MT}$ bei einer kleineren Ionenstärke ihren Abschluss als bei $\text{Cd}_7\text{-MT}$, und das Ausmass der Änderung ist nur etwa halb so gross.*

von 6700 liegt. Trotz merklich grösserem Molekulargewicht eluieren $\text{Hg}_7\text{-MT}$ und $\text{Hg}_{10}\text{-MT}$ mit K_D -Werten von 0.56 und 0.59, was im Fall von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ aber immer noch über dem aus Kettengewicht und Metallgehalt berechneten Wert liegt. Da $\text{Hg}_7\text{-MT}$ (Figur 4.X, Tabelle 4.XI) wie auch $\text{Hg}_{10}\text{-MT}$ als normalbreite Peaks eluieren, kann angenommen werden, dass beide Derivate monomer sind, dass also keine Oligomerisierung durch Oxidation der Thiolat-Gruppen oder Vernetzung durch Hg-Ionen über S-Hg-S Brücken stattgefunden hat.

Vergleicht man die durch Gelfiltration erhaltenen Verteilungskoeffizienten von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ und $\text{Hg}_{10}\text{-MT}$ mit denjenigen von Proteinen, deren Molekularge-



Figur 4.X: A) Gelfiltration von Dextranblau (— · — · —), nativem (Zn,Cd)₇-MT (-----), Hg₇-MT (——) und KI (·····) über Sephadex G-75 in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6). Hg₇-MT eluiert trotz grösserer Masse deutlich später als natives MT.

B) Bestimmung des Stokes' Radius von Hg₇-MT (◆) und Hg₁₀-MT (◆) mit Hilfe von Referenzproteinen (Δ) (vergl. Tabelle 4.X).

Tabelle 4.XI: Stokes' Radien (r_s) und Molekulargewichte (M_r) von verschiedenen MT's und Referenzproteinen evaluiert aus dem Gelfiltrationsverhalten auf Sephadex G-75 in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) (Figur 4.IX) (Kägi et al., 1974).

Nr.	Protein	K _D	M _r	r _s [Å]
1	Ovalbumin	0.17	45 000	28.1
2	Chymotrypsinogen	0.32	25 800	22.5
3	Myoglobin	0.43	17 000	19.6
4	Ribonuklease	0.48	13 700	12.0
5	R-LMT I nativ	0.52	6 800	16.2
6	Hg ₇ -MT	0.56	7 500	14.7
7	Hg ₁₀ -MT	0.59	8 100	13.9
8	Insulin A Kette ox.	0.64	2 500	12.2

wicht und Stokes' Radius bekannt sind (Figur 4.X), so erhält man für $\text{Hg}_7\text{-MT}$ und $\text{Hg}_{10}\text{-MT}$ Stokes' Radien von 14.7 Å und 13.9 Å. In beiden Fällen ist dieser trotz deutlich grösserer Molekülmasse beträchtlich kleiner als für natives $(\text{Zn,Cd})_7\text{-MT}$, apo-MT sowie für rekonstituiertes $\text{Zn}_7\text{-}$ und $\text{Cd}_7\text{-MT}$ (Tabelle 4.XI).

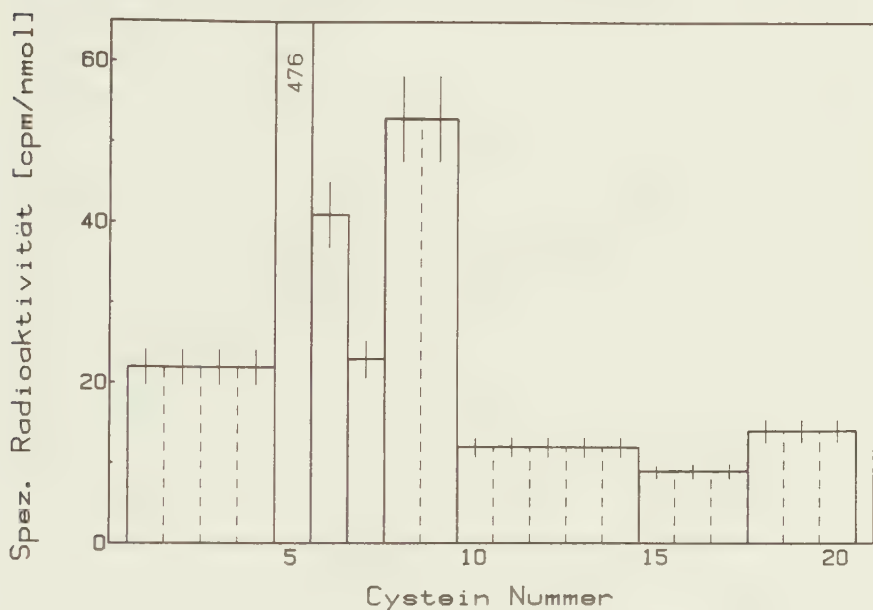
Trotz kleinerem Stokes' Radius zeigt $\text{Hg}_7\text{-MT}$ mit zunehmender Ionenstärke ein zu $\text{Cd}_7\text{-MT}$ ähnliches Verhalten. So verkleinert sich sein Stokes' Radius zwischen 5 und 150 mM Ionenstärke des Elutionspuffers der Gel-filtration von 14.8 auf 13.8 Å (Figur IX). Diese Reduktion ist jedoch nur etwa halb so gross wie bei $\text{Cd}_7\text{-MT}$, und erfolgt über ein kleineres Ionenstärke-Intervall (Vasak et al., 1983).

4.7 Differentielle Modifikation von $\text{Hg}_7\text{-Metallothionein}$

In $\text{Hg}_7\text{-MT}$ reagieren 7 Cys mit DTNB (vergl. 4.4). In der Annahme, dass dieselben 7 Cys auch mit Jodacetamid reagieren, wurde versucht, diese Reste mittels differentieller Modifikation zu identifizieren. Dazu wurden 800 nmol $\text{Hg}_7\text{-MT}$ mit 470 nmol radioaktivem Jodacetamid (2.5 μCi) während 2 min inkubiert. Dabei reagierte nur etwa 1 % des zugegebenen Jodacetamids entsprechend etwa 0.05 mol Cys/mol MT.

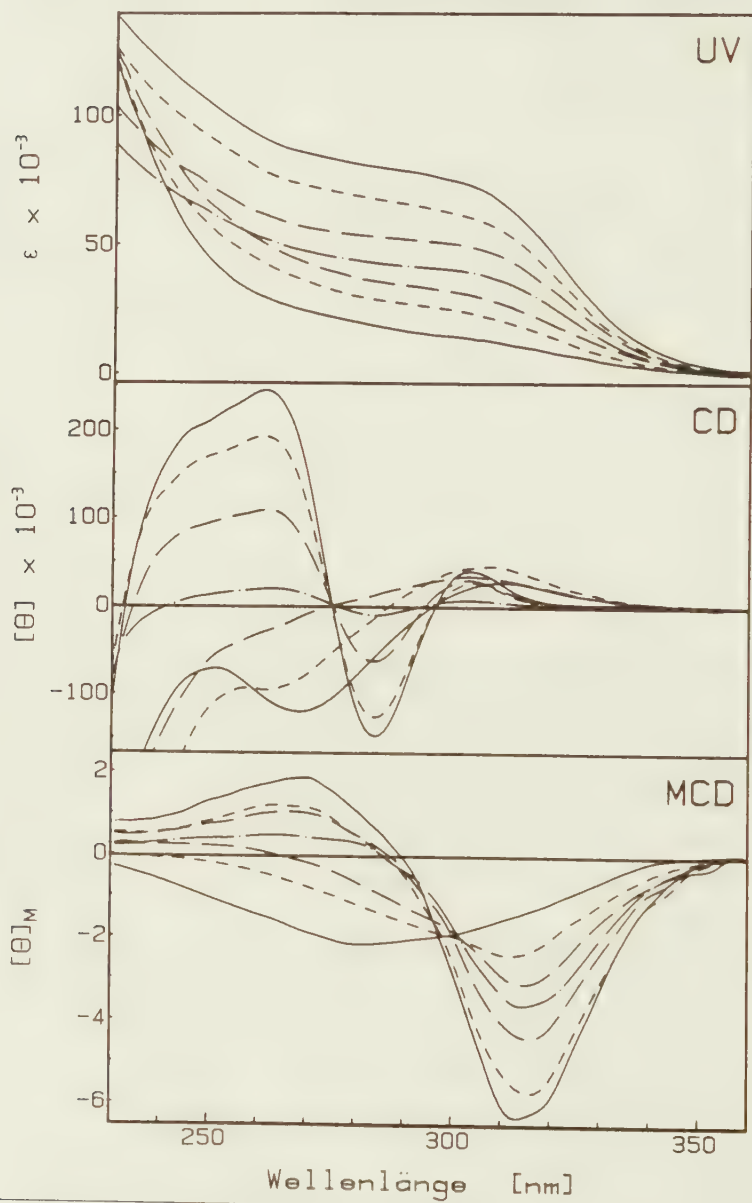
Nach vollständiger Abtrennung der Hg-Ionen vom partiell markierten MT (vergl. 3.7), wurde dieses vollständig mit nicht radioaktivem Jodacetamid modifiziert (vergl. 7.4), mit Trypsin verdaut und die spezifische Radioaktivität der mittels 'reverse phase' HPLC aufgetrennten Peptide bestimmt (vergl. 7.6 und 7.7).

Die geringe Menge des verbrauchten ^{14}C -Jodacetamids kommt in den eher kleinen spezifischen Radioaktivitäten der einzelnen Carboxyamidomethyl-Cys (CAM-Cys) enthaltenden Peptide zum Ausdruck (Tabelle 8.II). Erstaunlicherweise ist aber mehr als 60 % der eingebauten Radioaktivität an Cys_{19} (Cys Nr. 5) zu finden. Weiter sind die Cys des β -Clusters auch in $\text{Hg}_7\text{-MT}$ 2-5 mal (Cys_{19} sogar 50 mal) reaktiver als diejenigen des α -Clusters, wobei die reaktivsten Cys gegen die Mitte der Sequenz zu finden sind. Die unterschiedlichen Reaktivitäten der Cys in den beiden Clustern zeigen, dass in



Figur 4.XII: *Differentielle Modifikation mit ^{14}C -Jodacetamid. 60% der der Radioaktivität sind an Cys₁₉ gebunden. Weiter ist auffällig dass die N-terminale Hälfte, deutlich reaktiver ist als die C-terminale. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Cd₇- und Zn₇-MT gemacht. Die Cys sind nach ihrer Reihenfolge in der Sequenz nummeriert und die senkrechten Striche geben einen geschätzten relativen Fehler von 10 % des Wertes an.*

Hg₇-MT, wie in Cd₇-MT, die Cys des α -Clusters inerter sind (Figur 8.IIIH).



4.8 pH-Abhängigkeit der optischen Spektren von Hg_7 -Metallothionein

Die Veränderungen der optischen Spektren (UV, CD, MCD) von Hg_7 -MT bei Säurezugabe sind völlig anderer Natur, als diejenigen von Cd_7 - und Zn_7 -MT. Während in Hg_7 -MT die Hg-Ionen auch bei tiefem pH gebunden bleiben, dissoziieren Zn- und Cd-Ionen vom Protein. Wird das pH von 8.6 aus erhöht, so ändern sich die optischen Spektren von Hg_7 -MT nicht. Dies bedeutet, dass sich die Koordination von Hg(II) durch die Cys nicht verändert, und dass in Hg_7 -MT wie in Cd_7 - und Zn_7 -MT alle Cys an der Bindung von Hg-Ionen beteiligt sind.

In Figur 4.XIII sind die pH-bedingten Amplitudenänderungen im UV-, CD- und MCD-Spektrum bei repräsentativen Wellenlängen in Funktion des pH dargestellt. Auffallend ist dabei, dass alle drei Kurven eine sehr ähnliche Form aufweisen. Bei allen drei Spektroskopiearten zeigten sich eine Titrationsstufe zwischen pH 8.6 und 6 und ein steiler Abfall zwischen pH 6 und 4.

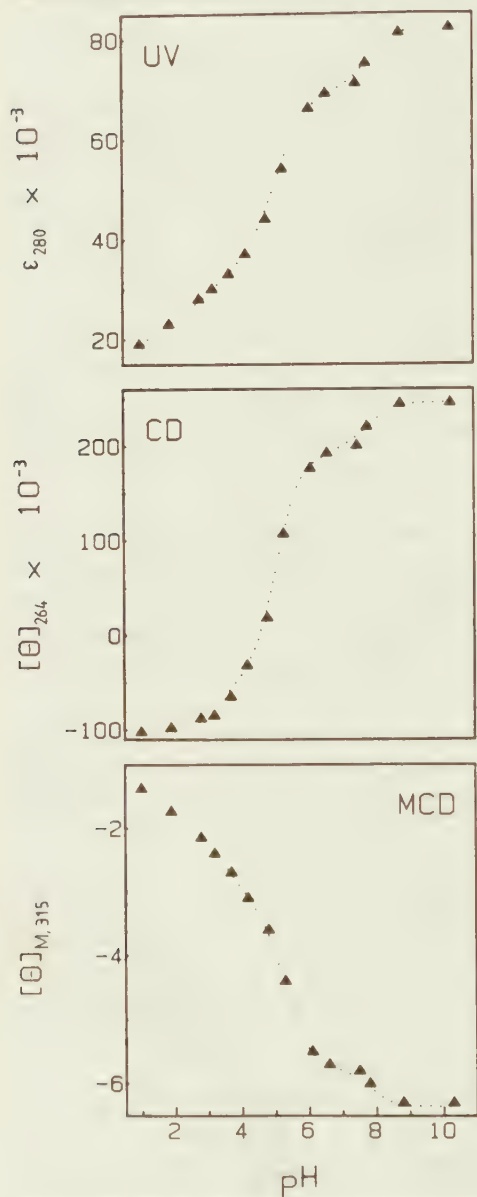
In Figur 4.XIII ist eine Auswahl der aufgenommenen Spektren eingezeichnet. Auffällig ist dabei, dass in allen drei Spektroskopiearten die Form der Spektren bis pH 5.5 etwa konstant bleibt und nur der Betrag der Amplituden kleiner wird. Unterhalb pH 5 finden im UV- und CD-Spektrum starke und im MCD-Spektrum etwas weniger ausgeprägte Änderungen der Form statt.

Die Formänderungen im UV-Spektrum fallen verglichen mit denjenigen in den beiden anderen Spektroskopiearten relativ klein aus. Hier wird zwischen pH 5 und 1 die Schulter unter Verminderung ihrer Intensität

Figur 4.XIII: *pH-Abhängigkeit des UV-, CD-, MCD-Spektrums von Hg_7 -MT. Die Spektren verändern sich oberhalb pH 8.5 nicht mehr. Beim UV- und CD-Spektrum ist die Form zwischen pH 8.5 und 5 nahezu unverändert, ändert aber rasch unterhalb pH 5.5, während sich die Form des MCD-Spektrums erst unterhalb von pH 4.5 ändert. Das MCD-Spektrum bei pH 1 hat dieselbe Form wie dasjenige von Hg_{11} -MT bei pH 8.6.*

(—) pH 8.8, 1; (----) pH 7.5, 3.7; (— — —) pH 6.1, 4.8; (— · — ·) pH 5.5

$\epsilon, \Delta\epsilon$ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[\theta]$ in $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$, $[\theta]_M$ in $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}\text{Gauss}^{-1}$



Figur 4.XIV: Abhängigkeit von ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$), $[\theta]_{264}$ ($degcm^2dmol^{-1}$) und $[\theta]_{Mmin}$ ($degcm^2dmol^{-1}Gauss^{-1}$) vom pH. In allen drei Spektroskopiearten erfolgen oberhalb von pH 8.5 keine Veränderungen. Während sich zwischen pH 8.5 und 6 die Form der Spektren kaum ändert finden starke Formänderungen zwischen pH 6 und 4 statt.

gegen höhere Energien verschoben. Dieselbe Verschiebung im sauren pH-Bereich ist auch in den MCD-Spektren sichtbar, nur wird hier der Betrag der minimalen Amplitude erhalten und neben dem Verschwinden des negativen Maximums bei 315 nm erscheint ein neues bei 280 nm. Interessant ist jedenfalls, dass das MCD-Spektrum von Hg₇-MT bei pH 1 (Figur 4.XIII) dieselbe Form hat wie dasjenige von Hg₁₁-MT bei pH 8.6 (Figur 4.III), wobei aber im ersten Fall die Intensität pro Hg 1.6 mal grösser ist als im zweiten.

Die Formänderungen im CD-Spektrum mit abnehmendem pH sind, verglichen mit denjenigen des UV- und MCD-Spektrums, völlig andersartig. Hier findet unterhalb pH 5 eine grundlegende Veränderung der Form des Spektrums statt, wobei das langwelligste Signal 10 nm ins Rote verschoben wird und die Banden bei 264 und 284 nm völlig verschwinden, so dass das Spektrum bei pH 1 eine neue Form mit vermutlich anderen Übergängen darstellt. Auffallend ist dabei, dass die Lage des bei pH 1 neu entstandenen Minimums nicht mit demjenigen des entsprechenden MCD-Spektrums zusammenfällt und auch das neu entstandene CD-Maximum bei 315 nm im MCD-Spektrum kein entsprechendes Signal aufweist.

4.9 Potentiometrische Titration von Hg₇-Metallothionein

Aus den Modifikationsstudien mit DTNB geht hervor, dass nicht alle Cys gleich stark an die 7 Hg(II) gebunden sind, und aus der pH-Abhängigkeit der optischen Spektren ist offensichtlich, dass einige Thiolat-Gruppen bereits bei neutralem pH protoniert werden.

Die potentiometrische Titration bestätigte diese Annahme, werden doch zwischen pH 8.6 und 2.5 insgesamt 9,9 mol H⁺/mol MT verbraucht (Figur 4.XVIA), ausser den 5 Carboxylgruppen (1 Glu, 3 Asp, C-Term; Gilg, 1985) werden in diesem pH-Bereich 5 Thiolat-Gruppen protoniert. Auf Grund der Ableitung der Titrationskurve (Figur 4.XVIB) zeigen einige dieser Thiolat-Gruppen einen apparenten pK_a von 5.4, während weitere Gruppen einen solchen von 3.7 aufweisen. Die gute Übereinstimmung dieses pK_a-Wertes mit dem apparenten pK_a der Carboxylgruppen in Apo-MT von 3.8 (Gilg, 1985) zeigt, dass in diesem pH-Bereich nicht nur Thiolat-Grup-

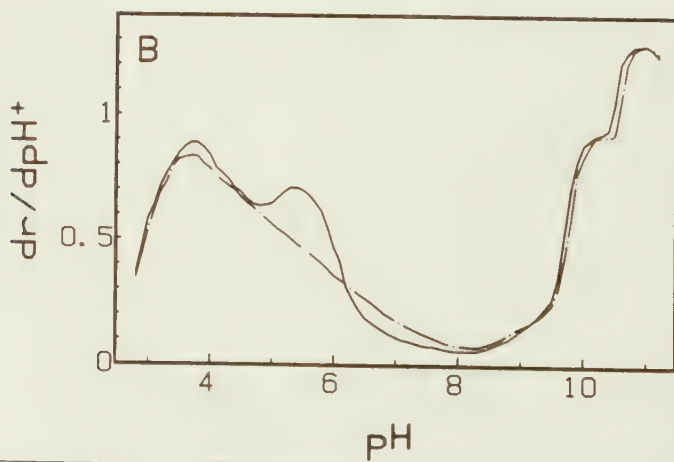
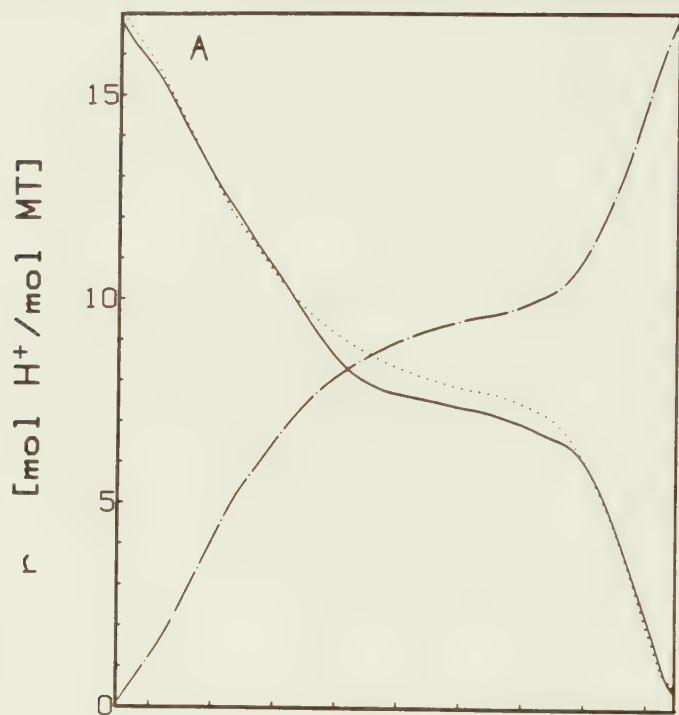


Tabelle 4.XV: Vergleich der apparenten pK_a -Werte von Hg_7 -MT mit denjenigen von Apo-MT und Cd_7 -MT (Gilg, 1985).

MT-Derivat	Carboxylgruppen ^{a)}	Thiolgruppen	Aminogruppen ^{b)}
Apo-MT	3.8	8.9	10.9
Cd_7 -MT	---	---	10.9
Hg_7 -MT	3.7	5.4, 7.0	10.3, 10.9

a) C-Terminus, 1 Glu und 3 Asp

b) 8 Lys; der pK_a -Wert von Arg wurde mit der Titration nicht erfasst

pen protoniert werden.

Werden die Resultate aus der potentiometrischen Titration mit den pH-bedingten Veränderungen der optischen Spektren verglichen (Figur 4.XIII), so stellt man fest, dass die zwischen pH 8.6 und 6 in den Kurven auftretende Stufe dem Verbrauch von $1.1 \text{ mol } H^+/\text{mol MT}$ entspricht. Dies deutet darauf hin, dass diese Änderungen in den optischen Spektren durch die Protonierung eines einzigen Thiolat-Liganden hervorgerufen werden.

Figur 4.XVI: (A) pH Titrationskurven von Hg_7 -MT titriert mit Säure und Base. Ein Teil des Hg_7 -MT's wird bei der Titration mit Base zwischen pH 5.5 und 10 und bei der Titration mit Säure zwischen pH 5.5 und 3.5 reversibel ausgefällt. Auffällig ist der hystereseartige Verlauf der Titrationskurven, wie aus dem Vergleich der Säure- und der transformierten Basentitrationskurve hervorgeht.

r = Anzahl protonierte oder deprotonierte Gruppen in $\text{mol } H^+/\text{mol MT}$
 (—) Titration mit Säure von pH 11.5 bis pH 2.5; (— · — ·) Titration mit Base von pH 2.5 bis pH 11.5; (·····) Transformierte Basentitrationskurve.
 (B) Ableitungen der in Abbildung (A) abgebildeten Kurven

Bei pH 8.6 trägt $\text{Hg}_7\text{-MT}$ eine Ladung von -2 e (vergl. 4.5). Auf Grund des Verbrauchs an Protonen ist der Isoelektrische Punkt etwa bei pH 5.6 zu finden. Bei diesem pH beginnt $\text{Hg}_7\text{-MT}$ bei der Titration mit Säure auszufallen, um sich unterhalb pH 3.5 rasch wieder zu lösen. Bei der Titration mit Base hingegen beginnt das Protein bei etwa pH 5.5 auszufallen, um sich oberhalb pH 9 wieder langsam zu lösen. Dieses Verhalten ist von einem hystereseeartigen Verlauf der Titrationskurve begleitet, wie aus dem Vergleich der Titration mit Säure und Base hervorgeht (Figur 4.XVI).

Werden die Ableitungen der Titrationskurven miteinander verglichen, so fehlt bei der Titration mit Base das bei der Titration mit Säure auftretende Maximum bei pH 5.4. Dieser Unterschied ist insofern bemerkenswert, als bei der Titration mit Säure das Maximum ausgebildet wird, während alles Protein noch in Lösung ist. Umgekehrt müsste bei der Titration mit Base dasselbe gelten, da auch in diesem Fall $\text{Hg}_7\text{-MT}$ erst oberhalb von pH 5.5 merklich ausfällt. Da dies nicht der Fall ist, wird deutlich, dass die Auflösung der Struktur von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ anders verläuft als deren Bildung. Auffällig ist auch, dass unterhalb pH 5 die Titrationskurven keinen hystereseeartigen Verlauf zeigen, obwohl in diesem pH-Bereich während der Titration mit Säure ein Teil des Proteins ausfällt.

Zwischen pH 8.6 und 11.5 sind ausser dem oben erwähnten hystereseeartigen Verlauf, keine Unterschiede zwischen den Titrationen mit Säure oder Base zu erkennen. Der Verbrauch von 7.5 mol OH^- resp. 7.2 mol H^+ per mol MT (die Differenz resultiert aus der Hysterese) entspricht etwa den aus der Aminosäureanalyse erhaltenen Mengen an Lys (8.3 mol/mol MT) und Arg (0.3 mol/mol MT). Auch der aus der Position des Maximums in der Ableitung erhaltene pK_a -Wert einiger Lys von 10.9, entspricht früheren Resultaten (10.85; Gilg, 1985). Einzig die gut ausgeprägte Schulter in den Ableitungskurven (Figur 4.XVIB) bei pH 10.3 weist darauf hin, dass einige Lys einen tieferen pK_a -Wert besitzen könnten.

Wird der Verlauf der Titrationskurven (Figur 4.XVI) mit der Abhängigkeit der optischen Spektren vom pH verglichen (Figuren 4.XIII und 4.XIV), so zeigt sich, dass die Protonierung oder Deprotonierung der Lys in diesen nicht in Erscheinung tritt. Weiter ist die stärkste Abnahme der Amplituden in allen drei Spektroskopiearten im Bereich der apparenten pK_a -Werte gewisser Hg-koordinierter Thiolat-Gruppen zu finden (pH 5.4), während die Veränderungen in den Spektrenformen eher mit der Protonie-

rung der Carboxylgruppen zusammenfallen. Leider ist es nicht möglich, mit der verwendeten experimentellen Anordnung unterhalb pH 2.5 noch verlässliche Resultate zu erhalten, so dass die Veränderungen in den optischen Spektren unterhalb dieses pH nicht mehr mit potentiometrischen Daten verglichen werden können.

5. DISKUSSION

5.1 Kinetische und thermodynamische Aspekte der Bindung von Hg(II) an Metallothionein

Die chemischen und thermodynamischen Eigenschaften von Hg-MT werden von der hohen Affinität von Hg(II) für die Thiolat-Gruppen von Cys bestimmt. Diese zeigt sich u. a. darin, dass Hg(II) im Gegensatz zu Cd(II) und Zn(II) bei jedem pH an Cys gebunden bleibt und dass trotz grösserem Ionenradius von Hg(II) die Hg-Thiolat-Bindung deutlich kürzer ist als die Cd-Thiolat-Bindung (Tabelle 2I). Trotz der starken Bindung verteilen sich die 7 Hg-Ionen bei pH 2 gleichmässig auf alle Proteinmoleküle, so dass Hg₇-MT in der Stärkegel-Elektrophorese in einer einzigen Bande mit der Ladung -2 e (pH 8.6) wandert. Ein Hinweis für die rasche Ausbildung eines einzelnen Komplexes bei tiefem pH ist weiter das Fehlen von Polymeren in den Gelfiltrationsprofilen von Hg₇- und Hg₁₀-MT (Figur 4.IX) und der wohl definierte Übergang zwischen Zunahme und Abnahme der Absorption bei 280 nm, wenn das Verhältnis von 7 mol Hg/mol MT erreicht wird.

Auch bei höherem pH findet in beschränktem Ausmass ein Austausch von Liganden statt. Dies zeigt sich bei der Herstellung von grösseren Mengen Hg₇-MT (vergl. 3.4), wo wegen der höheren Konzentration und dem grösseren Volumen die Durchmischung weniger optimal ist. Das so erhaltene Hg₇-MT zeigt nach der Herstellung ein Absorptions-Spektrum, das sich etwas von demjenigen des bei niedrigen Proteinkonzentrationen erhaltenen Spektrums unterscheidet (Bernhard, 1982). Nach 24 h verliert sich dieser

Unterschied jedoch durch Umorganisation des Komplexes. Ein weiterer Hinweis auf eine relativ leicht mögliche Umordnung der Thiolat-Liganden ist durch die Reversibilität der pH-bedingten Veränderungen gegeben.

Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Hg(II) -Thiolat-Bindungen im untersuchten pH-Bereich ziemlich labil sind und dass die thermodynamisch stabilste Koordination leicht erreicht wird. Untersuchungen an niedrigmolekularen Zn(II) -, Cd(II) - und Hg(II) -Thiolat-Komplexen unterstützen diese Schlussfolgerung. In ihnen wurde gezeigt, dass die Bindungsstärke der Metallionen der Gruppe IIB mit zunehmender Periode ansteigt, die Bindungen aber zunehmend labiler werden (Carson et al., 1981). Die kinetische Labilität der untersuchten Hg -Thiolat-Komplexe ist sogar so gross, dass in ^{199}Hg -NMR Messungen keine Signale auftreten (Carson & Dean, 1982).

Im Gegensatz zu Zn_7 - und Cd_7 -MT reagieren die Cys von Hg_7 -MT kaum mit Jodacetamid (vergl. 4.7, 8.1). Die starke Bindung an Hg(II) vermag somit die Thiolat-Gruppen vor der Modifikation zu schützen. In der Reaktion mit Jodacetamid (nukleophile Substitution 2. Ordnung) dürfte das freie Thiolat-Anion die reaktive Spezies bilden (vergl. 9.1). Wegen der geringen Reaktivität von Hg_7 -MT kann deshalb angenommen werden, dass trotz der Labilität der Hg(II) -Thiolat-Bindung die Cys-Reste kaum je als freie Thiolat-Gruppen vorliegen und der Ligandenaustausch assoziativ über die Bildung von Brückenliganden erfolgt. Dies wurde bereits für das kinetisch weniger labile Cd_6 -MT gezeigt (Nettesheim et al., 1985), wo Cd(II) im nicht vollbesetzten β -Cluster zwischen den Bindungsstellen leicht ausgetauscht werden kann.

Wie in $(\text{Cd,Zn})_7$ -MT sind vermutlich auch in Hg_7 -MT die Thiolat-Liganden verzerrt tetraedral um Hg(II) angeordnet, was u.a. zu intramolekularen Spannungen führen kann. Es ist deshalb nicht überraschend, dass trotz der sehr hohen Affinität von Hg(II) für Thiolat-Liganden nicht alle Cys vor der Modifikation mit DTNB geschützt sind und dass einige bei neutralem pH protoniert werden. Dieses Verhalten kann mit der Tendenz von Hg(II) lineare Komplexe zu bilden, in Zusammenhang gebracht werden. (Cotton & Wilkinson, 1974; S. 449f).

Der Verlauf der Modifikation von Hg_7 -MT mit DTNB (Figur 4.VII) ist grundsätzlich verschieden von demjenigen von Cd_7 - und Zn_7 -MT. Während Zn - und Cd -Ionen nicht genügend stark an die Cys-Thiolat-Gruppen bin-

den, um deren Reaktion mit DTNB zu verhindern, werden die meisten von ihnen durch Hg vor der Modifikation geschützt. Andererseits nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion von Zn₇-MT über Cd₇-MT zu Hg₇-MT stark zu, was mit der oben erwähnten zunehmenden Labilität der Thiolat-Bindungen von Zn(II) zu Hg(II) erklärt werden kann.

5.2 Optische Spektroskopie von Hg-Metallothionein

Die Metall-Thiolat Übergänge in Metallothionein

Apo-MT besitzt keine aromatischen Aminosäuren und absorbiert deshalb oberhalb 250 nm kaum. Während die Absorption unter 250 nm mit steigender Energie zunehmend von den Peptidbindungen und den Seitenketten der aliphatischen Aminosäuren stammt, wird die Absorption oberhalb 250 nm durch die Bindung von Metallionen bestimmt. Diese Absorption wird Ligand→Metall Charge-Transfer (LMCT) Übergängen zugeschrieben. Dabei handelt es sich bei den langwelligsten um erlaubte Übergänge von Elektronen aus Molekülorbitalen (MO), die hauptsächlich durch 3s und 3p Orbitale des Schwefels gebildet werden und überwiegend Ligandencharakter aufweisen, in MO's, welche aus Linearkombinationen des ns- und den np-Orbitalen des Metallions mit den 4s-Orbitalen der Thiolat-Liganden dargestellt werden. Zur Zeit herrscht aber noch keine Einigkeit über die genaue Formulierung der am angeregten Zustand beteiligten MO's (Jørgensen, 1967; Day & Seal, 1981). Weiter sind in der entsprechenden Literatur widersprüchliche Annahmen über die Beteiligung der gefüllten (n-1)d Orbitale des Metallions an der Metall-Thiolat-Bindung zu finden. Allgemein wird aber akzeptiert, dass diese mit zunehmender Polarisierbarkeit des Metallions zunimmt (Cotton & Wilkinson, 1974; SS. 142ff, 493f), was den kovalenten Charakter der entsprechenden Bindung erhöht und in ihrer Verstärkung zum Ausdruck kommt. Obwohl dies für die Reihe der IIB-Metallionen zutrifft, wird dieser Beitrag in den MO-Berechnungen vernachlässigt (Day and Seal, 1981).

Da wenig über die optische Spektroskopie der Hg-Thiolat-Verbindungen bekannt ist und auch die Theorie über die LMCT-Übergänge der d¹⁰ Metallionen nur wenig ausgearbeitet ist, wird in der Folge die Diskussion der

optischen Spektren von Hg-MT qualitativ gehalten. Dabei werden sie analog denjenigen von Cd-MT behandelt, welche in der Dissertation von H. Willner (1986) weitgehend interpretiert werden. Dieses Vorgehen scheint schon deshalb sinnvoll, weil die Spektren von Hg- und Cd-MT grosse Ähnlichkeiten aufweisen und bis auf die Lage der jeweiligen Banden in gleichartiger Weise von der Stöchiometrie der Metallionen abhängen.

Der Aufbau von Hg-Metallothionein

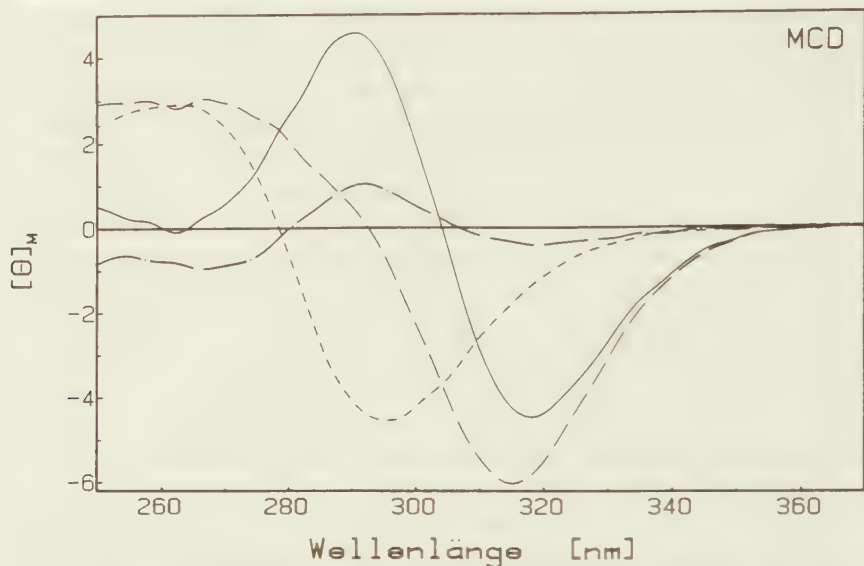
Die CD-Spektren von Apo- und Hg₁- bis Hg₇-MT (Figur 4.II) dokumentieren den Aufbau von Hg-MT am eindrucklichsten und zeigen, dass sich mit zunehmendem Hg-Gehalt die Organisation von Hg(II) am Protein ändert. Auf Grund der Modifikation mit DTNB (vergl. 4.4) kann angenommen werden, dass bei mehr als 3 mol Hg/mol MT Thiolat-Brückenliganden ausgebildet werden. Gleichzeitig mit dem Auftreten von Thiolat-Brücken verändern sich UV-, CD- und MCD-Spektrum. Während das langwelligste Signal der UV- und MCD-Spektren gegen niedrigere Energien verschoben wird, erscheint im CD-Spektrum bei 295 nm ein neues biphasisches Signal. Da solche Spektren bisher nicht beschrieben worden sind, können über die Art dieses neuen Übergangs nur Vermutungen angestellt werden. Da dieser erst mit höherem Hg-Gehalt erscheint und gleichzeitig mit der Ausbildung von Thiolat-Brückenliganden auftritt, wird angenommen, dass er von diesen hervorgerufen wird. Diese Annahme wird auch durch Daten aus spektroskopischen Titrationen von Modellpeptiden mit Cd(II) und Hg(II) unterstützt, welche ein ähnliches Verhalten mit zunehmendem Metall-Thiolat-Verhältnis zeigen (Willner, 1986).

In Anbetracht dessen, dass ein CD-Signal nur entsteht, wenn sich ein elektronischer Übergang in einer chiralen Umgebung befindet, erscheint es naheliegend, die CD-Signale in MT den Thiolat-Liganden zuzuschreiben, die am Aufbau der asymmetrischen Metall-Thiolat-Cluster beteiligt sind (Bühler & Kägi, 1979). Während das CD-Signal von Hg₁- bis Hg₃-MT von unverbrückten und deshalb isolierten Hg-Thiolat-Komplexen herrührt, werden durch die Entstehung der Brückenliganden die Hg-Thiolat-Komplexe in engen Kontakt miteinander gebracht. Dies begünstigt Interaktionen zwischen den Übergangsdipolmomenten benachbarter Thiolat-Liganden, was zur Ent-

stehung von excitonischer Kopplung führt, welche im CD-Spektrum als biphasisches Signal in Erscheinung tritt (Bühler & Kägi, 1979; Willner, 1986).

Die mit 4 mol Hg/mol MT neu auftretende Bande äussert sich im UV-Spektrum (Figur 4.II) als Rotverschiebung. Diese kann mit Hilfe der Inkrement-Differenzspektren (Δ_i UV) sichtbar gemacht werden. Auch hier zeigt sich wie in den CD-Spektren, dass die Zunahme der Amplitude bei niedrigem Hg-Gehalt vor allem bei 280 nm erfolgt und erst ab 4 mol Hg/mol MT die Zunahme bei 310 nm überwiegt. Demnach würde die Absorption bei 280 nm vor allem von Komplexen von Hg(II) mit terminalen Cys hervorgerufen, während die Signale bei höheren Wellenlängen von Brückenliganden herrühren.

Im MCD-Spektrum entwickeln sich schon bei niedrigem Hg-Gehalt von MT starke Signale, die bis 3 mol Hg/mol MT ohne Rotverschiebung anwachsen. Auf Grund des Vergleichs der MCD-Spektren der Komplexe von Cd und β -Mercaptoäthanol (Carson et al., 1981) kann angenommen werden, dass es sich bei diesem Übergang um einen A-Term handelt, dessen Nulldurchgang bei 280 nm mit der Position des Maximums des entsprechenden Absorptionssignals übereinstimmt, was darauf hinweist, dass es sich dabei um den gleichen Übergang handelt. Die mit dem Auftauchen der durch Thiolat-Brückenliganden hervorgerufenen Absorptionsbande eintretende Rotverschiebung des Spektrums kann als die Superposition zweier Signale aufgefasst werden. Wird angenommen, dass Hg₃-MT nur isolierte Hg-Thiolat-Komplexe mit insgesamt 12 terminalen Thiolat-Liganden aufweist, und dass in Hg₇-MT ebenfalls 12 terminale zusammen mit 8 Brückenliganden vorkommen, so sollte die Differenz der MCD-Spektren dieser beiden Spezies das Signal der Brückenliganden zeigen. Wie aus Figur 5.1 ersichtlich ist, ist dies auch der Fall. Das MCD-Differenzspektrum von Hg₇- und Hg₃-MT besitzt dabei ebenfalls die Form eines A-Terms mit einem Nulldurchgang bei 305 nm, was gut mit der Lage der Inkrement-Differenzspektren übereinstimmt. Nun lässt sich auch die vorübergehende Abnahme der Amplituden im MCD-Spektrum von Hg₄-MT gegenüber demjenigen von Hg₃-MT erklären. Diese Abnahme kann darauf zurückgeführt werden, dass es durch die Bindung eines zusätzlichen Hg-Ions bei gleichzeitiger Ausbildung von Brückenliganden dazu kommen kann, dass die Anzahl der terminalen Liganden vorübergehend abnimmt. Falls diese Erklärung zutrifft, kann man aus der



Figur 5.1: Die Differenz (—) der MCD-Spektren von Hg_3^- (-----) und $\text{Hg}_7\text{-MT}$ (---) zeigt die Form eines A-Terms. Daraus wird geschlossen, dass nicht nur das MCD-Signal der terminalen Thiolat-Liganden die Form eines A-Terms aufweist (vergl. Figur 4.11, MCD-Spektrum von $\text{Hg}_1\text{-MT}$), sondern auch dasjenige, der mit höherem Hg-Gehalt auftretenden Brückenliganden. Das MCD-Spektrum von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ ist demzufolge die Superposition dieser beiden A-Terme. Diese Annahme wird durch die Form der Differenz (— · —) der MCD-Spektren von $\text{Hg}_1\text{-MT}$ und $(\text{Hg}_1, \text{Zn}_6)\text{-MT}$ unterstützt (vergl. Text). $[\theta]_M$ in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Gauss}^{-1}$

Stagnation der Amplitude bei 265 nm trotz Zunahme des Hg-Gehaltes (zwischen 5 und 7 mol Hg/mol MT) schliessen, dass beim Einbau der letzten beiden Hg(II) vor allem Brückenliganden gebildet werden. Diese Schlussfolgerung würde ebenfalls durch die Inkrement-Differenz-Absorptionsspektren zwischen 4 und 7 mol Hg/mol MT bestätigt, da auch hier das Signal vor allem im Bereich der Absorptionsbande der Brückenliganden zunimmt und die Zunahme der Absorption bei 280 nm minimal ist.

Vergleicht man den oben postulierten Aufbau von Hg-MT mit demjenigen von Co- und Cd-MT, so zeigen sich grosse Parallelen. Bei beiden tritt die Ausbildung von Brückenliganden mit 3 - 4 mol Me/mol MT ein. Dies folgt einerseits aus der differentiellen Modifikation von partiell rekonstituierten Cd-MT's (vergl. 8.2, 9.3) und andererseits aus ESR-spektroskopischen Untersuchungen, die aufzeigen, dass in Co(II)-MT mit zunehmendem Gehalt an Co(II) antiferromagnetische Kopplungen auftreten, die auf die Ausbildung von Brückenliganden zurückzuführen sind (Vasak & Kägi, 1981). Die CD-Daten der Titration von Apo-MT mit Cd unterstützen auch die Annahme, dass die Form des CD-Spektrums von Hg₄- bis Hg₇-MT zumindest im roten Bereich durch excitonische Kopplung bestimmt wird, da in Cd-MT mit dem Auftreten von Brückenliganden das CD-Spektrum seine Form in ähnlicher Weise verändert, wie dies in Hg-MT geschieht (Willner, 1986).

Spektroskopie von (Hg,Zn)₇-Metallothionein

In Hg₁- bis Hg₆-MT sind nicht alle Metall-Bindungsstellen besetzt, was bedeutet, dass weder die Koordination der Metallionen noch die gesamte dreidimensionale Struktur des Proteins derjenigen von nativem oder vollständig rekonstituiertem MT entspricht. In den (Hg,Zn)₇-Hybriden wird jedoch von Anbeginn an immer ein vollständiger Satz Metallionen eingebaut. Auf Grund der wenig unterschiedlichen Bindungslängen der Hg- und Zn-Thiolat-Bindungen, der regelmässigen Änderungen in den optischen Spektren mit zunehmendem Hg-Gehalt und der Stabilität dieser Hybride, kann angenommen werden, dass sie eine mit nativem MT vergleichbare Struktur und Koordination aufweisen. Da die Zn-Thiolat-Bindung oberhalb 260 nm in den optischen Spektren kaum noch in Erscheinung tritt, erhält man mit diesen gemischt rekonstituierten MT's die Möglichkeit, die Hg-Thiolat-Chromophoren in etwa derselben Umgebung wie in Hg₇-MT zu studieren.

In allen drei Spektroskopiearten ist die Bande, die den Thiolat-Brückenliganden zugeschrieben wurde, schon bei niedrigem Hg-Gehalt vorhanden. In (Hg₁,Zn₆)-MT sind trotz vorhandenen Brückenliganden keine Kopplungen zwischen Übergängen benachbarter Hg-Thiolat-Komplexe möglich, was sich im CD-Spektrum dieser Spezies durch das Fehlen der negativen Amplitude bei 284 nm bemerkbar macht. Das Signal bei 305 nm

zeigt deshalb die Lage des durch die Brückenliganden verursachten Übergangs und bestätigt damit die Vermutung über die Position dieses Signals, die im vorigen Abschnitt anhand des MCD-Differenzspektrums von Hg_7^- und $\text{Hg}_3\text{-MT}$ gemacht wurde (Figur 5.I). Weitere Bestätigung erhält man aus der Bildung des Differenz-MCD Spektrums von $\text{Hg}_1\text{-MT}$ und $(\text{Hg}_1, \text{Zn}_6)\text{-MT}$. Während nach den obigen Annahmen im ersteren 4 terminale Liganden vorhanden sind, sollten im letzteren 1 bis 3 Brückenliganden auftreten. Das erhaltene Differenz-Spektrum sollte also eine biphasische Form aufweisen und einen Nulldurchgang bei etwa 310 nm zeigen. Dieses Spektrum wurde durch Subtraktion erhalten und ist in Figur 5.I aufgetragen und zeigt etwa die erwartete Form, wobei die erhaltene Asymmetrie durch die ungleiche Anzahl der terminalen Liganden in den beiden Spezies zustande kommt.

Bei der folgenden Zunahme des Hg-Gehaltes erhält man auf Grund der Form des CD-Spektrums schon bei $(\text{Hg}_2, \text{Zn}_5)\text{-MT}$ eine excitonische Kopplung, was darauf hinweist, dass die beiden Hg-Ionen im Protein nahe beieinander gebunden sind, sich also in demselben Cluster aufhalten müssen. Da bei den Hg,Zn-Hybriden Brückenliganden und Interaktionen zwischen den Übergangsdipolmomenten bereits mit 2 mol Hg/mol MT auftreten, zeigen die Absorptionsspektren dieser Spezies bei niedrigem Hg-Gehalt gegenüber jenen der entsprechenden Zn-freien Hg-MT's eine deutliche Rotverschiebung. Weiter fällt auf, dass die allgemeine Form der Hg,Zn-Hybridspektren sich mit zunehmendem Hg-Gehalt nicht mehr ändert, was darauf hindeutet, dass die Organisation der Metallionen gleich bleibt. Dies wiederum bestätigt die Annahme dass die Änderung der Spektrenform zwischen Hg_3^- und $\text{Hg}_4\text{-MT}$ durch die Neuorganisation der Hg-Thiolat-Komplexe zustande kommt.

Die Auflösung der Struktur von Hg_7^- -Metallothionein durch zusätzliche Bindung von Hg

Während bei der Zugabe von Cd oder Zn zu Cd_7^- oder $\text{Zn}_7\text{-MT}$ diese nicht mehr fest gebunden werden und deshalb keine oder nur noch geringfügige Änderungen in den optischen Spektren dieser MT's auftreten, binden wegen der hohen Affinität von Hg(II) alle über 7 mol Hg/mol MT hinaus zugegebe-

nen Hg-Ionen an die bereits durch Hg koordinierten Thiolat-Gruppen, was zur Auflösung der Struktur von $\text{Hg}_7\text{-MT}$ führt. Die Art und Weise der damit verbundenen Veränderungen in den optischen Spektren gibt aber Hinweise über die Art der Spektren von Hg-MT und die Koordination der Hg(II) in $\text{Hg}_7\text{-MT}$.

In allen drei Spektroskopiearten erhält man bei der Zugabe eines weiteren mols Hg/mol MT eine mehr oder weniger ausgeprägte Rotverschiebung. Wegen des bis auf das Vorzeichen identischen UV-Differenzspektrums von $\text{Hg}_8\text{-}$ und $\text{Hg}_7\text{-MT}$ mit demjenigen von $\text{Hg}_1\text{-}$ und $\text{Hg}_2\text{-MT}$ kann auf Grund der obigen Überlegungen angenommen werden, dass durch das zusätzliche Hg-Ion vor allem terminale Thiolat-Liganden in Brückenliganden übergeführt werden. Diese Interpretation wird auch durch die Änderungen in den CD- und MCD-Spektren von $\text{Hg}_8\text{-MT}$ gestützt, bei denen in beiden Fällen das den terminalen Liganden zugeschriebene Signal bei 264 resp. 270 nm, gegenüber $\text{Hg}_7\text{-MT}$ stark vermindert ist. Weiter könnte die leichte Abnahme der CD-Bande bei 284 nm auf verminderte excitonische Kopplung zwischen den Übergängen zurückgeführt werden. Auf Grund der relativ kleinen Änderungen im CD-Spektrum kann aber angenommen werden, dass die Struktur im grossen und ganzen erhalten bleibt und die Organisation wie auch die Koordination von Hg(II) sich nur wenig ändert.

Die grossen Änderungen in allen drei optischen Spektren bei der Zugabe des neunten Mols Hg weisen hingegen auf eine weitgehende Auflösung der Struktur hin. Dies äussert sich in einer starken Reduktion der Amplituden des CD-Spektrums, was auf eine weitgehende Aufhebung der excitonischen Kopplung zurückzuführen ist. Weiter zeigt das kleine Signal auch, dass in den Hg-MT's mit 9 und mehr mol Hg/mol MT die strukturelle Organisation der einzelnen Chromophoren immer symmetrischer wird.

Im UV- und MCD-Spektrum sind die Änderungen, die durch die Zugabe des neunten Mols Hg verursacht werden, weit weniger dramatisch und entsprechen etwa den vorhergegangenen. Einzig im UV-Inkrement-Differenzspektrum lässt sich erkennen, dass nun vermehrt auch verbrückte Strukturen aufgelöst werden, da die Absorption besonders im roten Bereich des Spektrums abnimmt. Bei weiterer Erhöhung des Hg-Gehaltes verschiebt sich jedoch auch das MCD-Spektrum gegen höhere Energien, um mit 11 mol Hg/mol MT eine völlig neue Form anzunehmen, die sich mit 12 mol Hg/mol MT noch verstärkt, während im UV-Spektrum nach 10 mol Hg/mol MT kaum noch Änderungen auftreten.

Die schwachen CD-Signale von Hg_{10} - und Hg_{11} -MT oberhalb von 260 nm deuten auf eine homogene, wenig asymmetrische Struktur dieser Spezies hin, was bei linearer Koordination der Hg(II) erwartet wird. Dies erscheint auch in Anbetracht des Hg -Thiolat-Verhältnisse von etwa 2 und der bekannten Tendenz von Hg(II) zu linearer Koordination recht wahrscheinlich. Zusätzlich wird diese Annahme auch durch die spektroskopische Titration von Modellpeptiden unterstützt, welche bei etwa dem gleichen Hg -Thiolat-Verhältnis ein nahezu identisches MCD-Spektrum zeigen (Willner, 1986).

5.3 pH-Titration von Hg_7 -Metallothionein

Die pH-abhängigen Veränderungen von Hg_7 -MT unterscheiden sich stark von denjenigen von Zn_7 - und Cd_7 -MT. Während bei den letzteren die Metallionen durch Protonen vom Protein verdrängt werden, bleiben die Hg -Ionen an MT gebunden. Zwischen pH 8.6 und 5.5 verändern sich UV-, CD- und MCD-Spektrum in ähnlicher Weise. Während die Abnahme der Amplituden in allen drei Spektroskopiearten demselben Muster folgt (Figur 4.XIV), bleibt die Form der Spektren nahezu konstant (Figur 4.XIII). Werden die Daten aus der spektroskopischen Titration mit denjenigen aus der potentiometrischen Titration verglichen, so zeigt sich, dass die grossen Änderungen in der Intensität der Spektren in diesem pH-Bereich von einem Verbrauch von etwa zwei Protonen begleitet ist, wovon eines im Bereich des stufenförmigen Verlaufs der Amplitudenabnahme (Figur 4.XIV) der optischen Spektren vom Protein aufgenommen wird.

Mit der Protonierung von weiteren Thiolat-Liganden unterhalb von pH 5.5 treten starke Änderungen in den Spektren auf. Im UV-Spektrum nimmt die Absorption unterhalb 230 nm rasch zu, währenddem sie bei 300 nm weiter abnimmt. Da die Form des UV-Spektrums sich damit denjenigen von Hg_9 - bis Hg_{11} -MT angleicht, könnte dies auf die Zunahme von linear koordinierten Hg -Ionen hinweisen. Die Änderungen, die in den MCD-Spektren sichtbar werden, zeigen in dieselbe Richtung. Auch der kontinuierliche Übergang in ein Spektrum, das bei pH 1 beinahe dieselbe Form aufweist wie dasjenige von Hg_{11} -MT bei pH 8.6, liesse sich in der gleichen Art und Weise interpretieren. Zudem sind unterhalb pH 2.5 fünf oder mehr Cys pro-

toniert und kommen als Liganden nicht mehr in Frage, so dass das Verhältnis der koordinierenden Cys zu den gebundenen Metallionen sehr nahe bei 2 liegt. Es ist deshalb naheliegend, anzunehmen, dass mit abnehmendem pH ein immer grösserer Anteil der Hg-Ionen linear koordiniert wird.

Das CD-Spektrum zeigt mit abnehmendem pH jedoch ganz andersartige Veränderungen. Vor allem das Erscheinen der neuen Bande bei 320 nm lässt sich mit dem oben entwickelten Modell nicht erklären. Andererseits zeigt Cd-MT bei pH 2.5 ein CD-Spektrum mit derselben Form und auch in diesem Fall erscheint im roten Bereich des Spektrums eine neue Bande (Gilg, 1985). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass es sich dabei um isolierte tetraedrale Strukturen von 2 Cd und 6 Thiolat-Liganden handeln könnte, welche relativ hohe Symmetrie aufweisen und deshalb nur ein schwaches Cd-Signal verursachen (Gilg, 1985; Vasak & Kägi, 1983). Im Falle von Hg₇-MT könnten solche symmetrischen Strukturen beim Unterschreiten von pH 5.5 auftreten, da auch hier bei kleinen Elliptizitäten die Bande bei 320 nm rasch wächst. Die Abnahme dieses Signales bei tieferem pH könnte dann als Auflösung dieser Strukturen und Übergang zu vermehrt linearer Koordination betrachtet werden.

Bis pH 2.5 können die Veränderungen der Spektren mit der Protonierung von Cys-Guppen korreliert werden. So entspricht die in allen drei optischen Spektren erscheinende Stufe (Figur 4.XIV) in der Abnahme der Amplitude fast genau der Protonierung eines Thiolat-Liganden und die grossen Veränderungen unterhalb pH 5 zeigen sich in der Nähe des apparenten pK_a -Wertes von Cys-Hg-Komplexen (Figur 4.XVI). Die Identifikation von apparenten pK_a -Werten weiterer Thiolat-Gruppen wird jedoch durch die Überlagerung mit den Titrationsstufen der Carboxylgruppen verunmöglicht, aber auf Grund der Modifizierbarkeit von 7 Cysteinen mit DTNB lässt sich vermuten, dass noch weitere Thiolat-Gruppen mit abnehmendem pH protoniert werden.

Aus dem Verbrauch an Säure oder Base bei der potentiometrischen Titration ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zu den Resultaten von D. Gilg (1985) für Apo- und Cd₇-MT-1. Die Übereinstimmung der durchschnittlichen apparenten pK_a -Werte zeigt, dass wie in Apo-MT auch in Hg₇-MT bei pH 3.9 Carboxylgruppen titriert werden. Auch die apparenten pK_a -Werte der Lys stimmen innerhalb der zu erwartenden Messgenauigkeit (± 0.1 pH) mit den für Cd₇-MT erhaltenen Werten (Tabelle 4.XV) überein. Der einzige

Unterschied liegt darin, dass in Hg-MT nicht alle Lys-Reste denselben apparenten pK_a -Wert von 10.9^1) aufweisen (Gilg, 1985; Tabelle 4.XV), wie der Verlauf der ersten Ableitung der Titrationskurve (Figur 4.XVIB) anzeigt, sondern einige einen solchen von etwa 10.3 besitzen.

Während Cd_7 -MT über den ganzen pH-Bereich in Lösung bleibt, beginnt Hg_7 -MT im Bereich des isoelektrischen Punktes (etwa pH 5.6) auszufallen. Dies ist überraschend, da MT einen hohen Anteil an polaren Aminosäuren besitzt und sich bei neutralen pH deshalb hoch-konzentrierte Protein-Lösungen herstellen lassen (bis ≈ 100 mg/ml). Wegen der grösseren Affinität von Hg(II) und dessen Tendenz, verbrückte Komplexe zu bilden, wäre es jedoch möglich, dass bei fehlender elektrostatischer Abstossung die einzelnen Moleküle aggregieren. Diese Aggregate könnten sich mit zunehmender Ladung bei tieferem oder höherem pH wieder trennen, was sich in der erneuten Auflösung des Proteins äussern würde.

5.4 Form und molekulare Dynamik von Hg-Metallothionein

Der verglichen mit Cd_7 -MT (16.2 Å) bedeutend kleinere apparente Stokes' Radius von Hg_7 -MT (14.7 Å) ist überraschend. Der Unterschied ist zu gross, um ihn auf die kürzere Hg-S Bindung zurückführen zu können (Tabelle 2.I), vor allem weil Zn_7 -MT mit der noch kürzeren Zn-Thiolat-Bindung denselben Stokes' Radius aufweist wie Cd_7 -MT. Dieser unterschiedliche apparente Stokes' Radius deutet auf eine etwas andere Form des Proteins hin. Auf Grund des 'Rigid Sphere' Modells (Cantor & Schimmel, 1982; S.557ff), das das Molekulargewicht eines Proteins mit seiner Form in Beziehung bringt, erhält man für Cd_7 -MT ein spindelförmiges Rotationsellipsoid mit einem Achsenverhältnis von 6, sofern man eine durchschnittliche Hydratation von 0.2 g H_2O /g Protein annimmt. Auf Grund der gleichen

¹) Der hohe pK_a -Wert der Lys-Seitenketten wird auf die Interaktion der positiv geladenen ϵ -Aminogruppen der Lys-Seitenketten mit der negativen Überschussladung der Hg-Thiolat-Cluster zurückgeführt (Pande et al., 1985).

Berechnungen bekommt man für Hg₇-MT jedoch ein Achsenverhältnis von vier. Die analoge Abhängigkeit der Stokes' Radien von Hg₇- und Cd₇-MT von der Ionenstärke und die grosse Ähnlichkeit der optischen Spektren dieser beiden Spezies, lassen jedoch kaum eine völlig andere Form erwarten. Eine Erklärung für diesen Unterschied im apparenten Stokes' Radius wäre eine Änderung in der intramolekularen Beweglichkeit, die zu einer anderen durchschnittlichen Form führen könnte. Diese Erklärung erscheint insofern plausibel, da die schwereren Hg-Cluster zu einer niedrigeren Schwingungsfrequenz zwischen den beiden Domänen führen könnten. Für diese Erklärung spricht auch, dass Pb₇- und Bi₇-MT bei etwa derselben Masse der Metallionen denselben Stokes' Radius aufweisen (Good, 1986). Der noch niedrigere Stokes' Radius von Hg₁₀-MT wäre zusätzlich auf die unterschiedliche Koordination der Hg-Ionen zurückzuführen. Hier könnte man sich vorstellen, dass die Hg-Ionen das Protein recht zufällig vernetzen und dass so eine mehr kugelförmige Struktur entsteht.

Wegen der zahlreichen geladenen Gruppen in Hg₇-MT ist es nicht sehr überraschend, dass sich dessen Stokes' Radius mit zunehmender Ionenstärke verändert, kann doch die Assoziation der geladenen Gruppen des Proteins mit einem Gegenion zur Neutralisierung von lokalen Ladungen und damit zur Stabilisierung der gesamten Struktur führen. Ein Hinweis auf eine grössere Stabilität bei erhöhter Ionenstärke ist auch, dass Hg₇-MT bei höheren Konzentrationen (> 50 µM) nur bei der Anwesenheit von 0.2 bis 0.5 M KCl in Lösung bleibt, und sonst langsam präzipitiert.

Betrachtet man die Resultate, die aus der differentiellen Modifikation von Hg₇-MT mit Jodacetamid erhalten wurden (Figur 4.XII), so fallen grosse Ähnlichkeiten zu den mit Cd₇-MT erzielten Ergebnissen auf (Figur 8.IIIH). Wie in Cd₇-MT sind auch in Hg₇-MT die N-terminalen 9 Cys, die zum β-Cluster gezählt werden, bedeutend reaktiver. Erstaunlich ist aber das Ausmass dieser Reaktivitätsunterschiede. Während bei Cd₇-MT alle N-terminalen Cys etwa 3 mal reaktiver sind, zeigt sich in Hg₇-MT, dass Cys₁₉ allein 60 % der inkorporierten Radioaktivität enthält und damit etwa 50 mal reaktiver ist als die restlichen Cys. Im β-Cluster existiert also ein besonders leicht austauschender und leicht modifizierbarer Ligand, der die beobachtete Polymerisation bei hoher Konzentration oder niedriger Ladung des Proteins bewirken könnte. Andererseits könnte man aufgrund der Überlegungen in 6.2 und 9.4 annehmen, dass dieser Cys-Rest am wenigsten stark

gebunden ist. Dies wiederum würde bedeuten, dass es sich bei Cys₁₉ um die zwischen pH 9 und 6 titrierbare Gruppe handelt.

5.5 Koordination und Organisation der an Metallothionein gebundenen Hg-Ionen

Die Ähnlichkeit der optischen Spektren von Cd- und Hg-MT zeigt zumindest, dass grosse strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen diesen Derivaten bestehen. Bezüglich der Organisation der Me-Ionen deuten alle Resultate darauf hin, dass in Hg₇-MT ebenso wie in Cd₇-MT die Me-Ionen in einem 3 und 4 Me-Cluster tetraedral gebunden vorliegen. Auch die Ausbildung dieser Cluster erfolgt in ähnlicher Weise. So treten mit 3-4 mol Hg/mol MT im UV-, CD- und MCD-Spektrum deutliche Zäsuren auf (Figur 4.V). Wie in Cd₇-MT wo der C-terminale α -Cluster zuerst gebildet wird, besteht auch für Hg₇-MT die berechnete Vermutung, dass dieser Cluster stabiler ist. Dies wird auch durch die Resultate der differentiellen Modifikation von Hg₇-MT gestützt (Figur 4.XII, vergl.9.7), in denen sich zeigt, dass wie in Cd₇-MT die N-terminalen 9 Cys labiler sind als die 11 C-terminalen Cys (vergl. 9.4; Figur 8.IIIH).

Beim Vergleich der Strukturen von Hg₇-MT und Cd₇-MT stellt sich die Frage nach der Koordinationsgeometrie der Hg-Ionen. Die Übereinstimmung der optischen Spektren mit Cd₇-MT kann dabei als Hinweis für eine analoge tetraedrale Koordination der Hg-Ionen in Hg₇-MT betrachtet werden. Dies wird auch durch die semiempirische Theorie von Jörgensen (1970) über die Lage des langwelligsten LMCT-Übergangs auf Grund der optischen Elektro-negativitäten von Metallion und Ligand unterstützt. Die darin für tetraedrale Geometrie abgeleitete Formel:

$$\nu = 3.0 \times [x_{\text{opt}}(\text{L}) - (x_{\text{opt}}(\text{M}))]$$

ergibt die Lage dieses Übergangs in Wellenzahlen (in m⁻¹). Werden die entsprechenden Grössen eingesetzt ($x_{\text{opt}}(\text{S})=2.6$) und ($x_{\text{opt}}(\text{Hg(II)})=1.5$), so erhält man 303 nm für die Lage des langwelligsten Übergangs in Hg-MT (Vasak & Kągi, 1981). Wird die Lage des langwelligsten Übergangs von

Hg₇-MT aus den Spektren abgeschätzt, so erhält man für das durch die Brückenliganden verursachte Signal etwa 307 nm. Diese gute Übereinstimmung mit der Vorhersage ist beachtlich, vor allem, wenn man bedenkt, dass die Werte für die optischen Elektronegativitäten aus Absorptionsspektren von verbrückten tetraedralen Tetrahalogenid-Komplexen abgeleitet wurden (Day and Seal, 1981; Cotton & Wilkinson, 1974; SS. 294ff, 550f).

Für die Position des elektronischen Übergangs, der dem Komplex mit den terminalen Liganden zugeordnet wird, erhält man aus den optischen Spektren von Hg₁- bis Hg₃-MT den Wert von 280 nm. Dies wiederum stimmt überraschend gut mit der Position des langwelligsten Übergangs von K₂Hg(SCN)₄ bei 280 nm (Jørgensen, 1970) überein. Da in dieser Verbindung Hg(II) ebenfalls tetraedral koordiniert ist, kann auch diese Übereinstimmung als ein Hinweis auf eine entsprechende Koordination der Hg-Ionen in Hg₇-MT gewertet werden. Endgültige Klarheit über diese Zuordnung dürfte jedoch erst der Vergleich mit Spektren von Modellverbindungen oder die Röntgenstrukturanalyse bringen.

II. TEIL

UNTERSUCHUNG DER CLUSTERBILDUNG IN Cd-METALLOTHIONEIN DURCH DIFFERENTIELLE MODIFIKATION

6. EINLEITUNG

6.1 Ausgangslage, Problemstellung

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre wiesen darauf hin, dass nicht alle von Metallothionein (MT) komplexierten Cd-Ionen gleich stark gebunden werden. Aus potentiometrischen Titrationsen (Vasak und Kägi, 1983) ging z.B. hervor, dass von den sieben gebundenen Cd-Ionen drei etwa 50 mal leichter dissoziierten als die restlichen vier. Dieses Resultat wurde dahingehend interpretiert, dass die Cd-Ionen des C-terminalen Cd_4 -Clusters (α -Cluster) stärker gebunden sind als diejenigen des N-terminalen Cd_3 -Clusters (β -Cluster).

In einer zweiten Arbeit wurden partiell und vollständig rekonstituierte Cd-MT's mit Subtilisin, einer unspezifischen Protease, verdaut (Nielson und Winge, 1983). Erstaunlicherweise wurden nach Elektrophorese der Verdauungsprodukte nur der α -Cluster und unverdautes Cd_7 -MT gefunden. Aus diesem Resultat wurde geschlossen, dass die Bindung von Cd an Apo-MT stark kooperativ ist, d.h. dass nur Apo-MT, Cd_4 -MT und Cd_7 -MT in Lösung existieren können. Weiter wurde geschlossen, dass der α -Cluster Cd(II) stärker bindet als der β -Cluster.

Der Schluss auf eine strikte Kooperativität der Cd-Bindung auf Grund von Verdauungsuntersuchungen mit einer Protease ist zweifelhaft, da nicht die thermodynamischen Eigenschaften der Cd-Bindung über die Verdaubarkeit oder Erhaltung der Peptidkette entscheiden, sondern die Spezifität des Enzyms für Sekundärstrukturen, also die Art und Weise der räumlichen Faltung der Peptidkette. Es ist also durchaus möglich, dass während der Ver-

dauung mit Subtilisin relativ schlecht fragmentierbare Formen, im vorliegenden Fall der α -Cluster und das Cd₇-MT, als langsam reagierende Zwischenprodukte angehäuft werden.

Die Arbeit von Nielson und Winge (1983) steht auch im Widerspruch zu spektroskopischen Daten von H. Willner (1986), die aufzeigen, dass die ersten Cd-Ionen anders gebunden werden als die folgenden, da die Form des CD-Spektrums bei höheren Cd/Protein-Verhältnissen völlig verschieden ist von derjenigen bei niedrigen Cd/Protein-Verhältnissen. Dieselbe Situation findet sich auch bei der schrittweisen Rekonstitution von Hg-MT (vergl. 4.2, Figur 4.II). Dazu kommt weiter, dass es unwahrscheinlich ist, bei so kleinen Unterschieden in der Affinität der Cd-Ionen zu den metallbindenden Domänen in Apo-MT so ausgeprägte Kooperativität zu finden.

Um ein genaueres Bild von der Cd-Bindung und dem Aufbau der Cd-Thiolat-Cluster in MT zu erhalten, müssen direktere Bestimmungen durchgeführt werden, die Zwischenzustände erfassen. Als Methode der Wahl bot sich die Technik der differentiellen Modifikation an.

6.2 Zur Methode der differentiellen Modifikation

Die Methode der differentiellen Modifikation wurde von Kaplan et al. (1971) für die Bestimmung von lokalen pK-Werten von Aminogruppen an Proteinoberflächen und von Bosshard (1979) zur Identifizierung von Kontaktflächen von interagierenden Proteinen entwickelt. Mittels differentieller Modifikation können mit substöchiometrischen Mengen von modifizierendem Reagens die Reaktivitäten einer Anzahl gleichartiger chemischer Gruppen bestimmt werden, ohne dass das System in seinem Zustand stark gestört wird. Differentielle Modifikation reflektiert also in erster Linie kinetische Aspekte (Reaktivität). Da diese aber durch thermodynamisch bestimmte Zustände beeinflusst sind, lassen sich auch Aussagen über die thermodynamischen Eigenschaften von Systemen erhalten. Wichtig ist dabei die Kenntnis des Reaktionsmechanismus, der Spezifität des Reagens sowie der mit dem modifizierenden Reagens reagierenden Gruppen.

Die differentielle Modifikation wird in zwei Stufen durchgeführt. In einem ersten Schritt wird eine kleine Menge von einem radioaktiven, gruppenspe-

zifischen Reagens zur Probe gegeben, durch welches die zu modifizierenden Gruppen, je nach ihrer Reaktivität, unterschiedlich stark markiert werden. In einem zweiten Schritt wird das ganze Protein mit demselben, aber nicht radioaktiven, Reagens vollständig modifiziert, um ein chemisch homogenes Produkt zu erhalten. Dieses wird in weiteren Schritten fragmentiert und die spezifische Radioaktivität der einzelnen modifizierten Gruppen bestimmt.

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurde als Reagens Jodacetamid, ein kleines und ungeladenes Molekül, gewählt. Dies ist wichtig, da dadurch sterische Hinderungen eingeschränkt und elektrostatische Wechselwirkungen vermieden werden. Jodacetamid reagiert bei pH 8.6 spezifisch in einer SN_2 -Reaktion mit den Thiolat-Gruppen der Cys ohne die Amino-gruppen zu modifizieren, was für die Erhaltung der Lysine als tryptische Spaltstellen für die nachfolgende Fragmentierung wichtig ist. Weitere Vorteile der Modifikation mit Jodacetamid bestehen in der guten Löslichkeit des vollständig modifizierten Proteins, sowie der hervorragenden Auftrennbarkeit der tryptischen Peptide mit 'reverse phase' HPLC (Münger et al., 1985).

7. MATERIALIEN UND METHODEN

7.1 Das verwendete Metallothionein

Alle folgenden Arbeiten wurden an MT-1 oder 2 aus Kaninchenleber (R-LMT) ausgeführt. Falls die Kenntnis der Aminosäuresequenz erforderlich war, wurde R-LMT-2 verwendet. Alle anderen Experimente wurden an R-LMT-1 ausgeführt. Die Reindarstellung der beiden Isoformen wurde unter 3.1 beschrieben, die Herstellung von Apo-MT unter 3.2 .

7.2 Rekonstitution von Cd-Metallothionein

Zur Vermeidung der Oxidation von freien SH-Gruppen durch Luftsauerstoff wurden alle präparativen Arbeiten in einer N₂-gespülten Glovebox bei Zimmertemperatur ausgeführt. Alle Lösungen wurden zudem vorgängig mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei 0.01 Torr entgast. Für die Rekonstitution von Cd-MT mit 1 bis 7 mol Cd/mol MT wurden 500 nmol ($\approx$ 3 mg) Apo-MT in 0.1 M HCl gelöst. Die entsprechende Menge CdCl₂ wurde in 0.01 M HCl aufgelöst beigefügt. Damit in allen Proben dieselbe Menge HCl vorhanden war, wurden die unterschiedlichen Volumina durch die Zugabe von 0.01 M HCl ausgeglichen. Anschliessend wurde das pH mit 1 M Tris unter kräftigem Mischen langsam auf 8.6 (Tris : HCL = 4 : 1) gebracht. Die Endkonzentration von Cd-MT betrug $\approx$ 0.5 mg/ml. Damit die rekonstituierten Formen von Cd-MT sicher im thermodynamischen Gleichgewicht vorlagen, wurden die neu hergestellten Proben mindestens eine Stunde stehen gelassen.

7.3 Kinetik der Modifikation mit Jodacetamid und DTNB

Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Cd-Gehalt von MT wurden 150 nmol jeder Probe aus 7.2 sowie Apo-MT mit 1.5 Äquivalent Jodacetamid pro Äquivalent Cys gemischt und zur Quantifizierung der modifizierten Cys wurden Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten (2 Minuten bis 5 Stunden) entnommen. Um die Reaktion abubrechen, wurden diese mit einem gleichen Volumen 1 M HCl versetzt. Die Proben wurden anschliessend am Rotationsverdampfer eingetrocknet und in 6 M HCl 14 Stunden bei 110° unter Luftausschluss hydrolysiert und der Anteil der modifizierten Cys wurde anschliessend mittels automatischer Aminosäureanalyse bestimmt. Die erhaltene Menge an CM-Cys wurde dabei auf die Menge Ala des entsprechenden Isoproteins bezogen. Als Farbwert für CM-Cys wurde derjenige von Asp mal 0.9 angenommen (Glazer et al., 1975; S. 24).

Die Reaktion der gleichen Proben (pH 8.6) wurde nach Zugabe eines 12-fachen Überschusses von DTNB bei 412 nm mit einem Dioden-Array-Spektrophotometer bei 23° während 5 min verfolgt. Um die Oxidation der

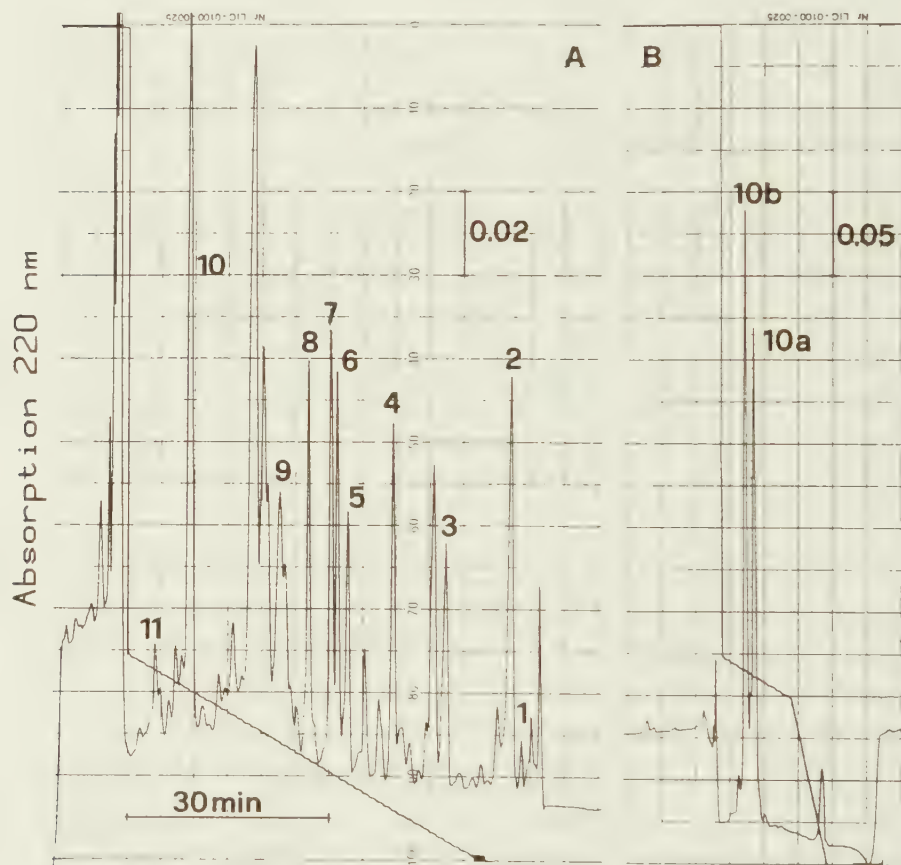
freien SH-Gruppen sowie des bei der Reaktion entstehenden Farbstoffes klein zu halten, wurden alle verwendeten Lösungen vorher entgast und mit Stickstoff gesättigt.

7.4 Differentielle Modifikation mit ^{14}C -Jodacetamid

Für die differentielle Modifikation von Apo-MT und der rekonstituierten Cd-MT's (siehe 7.2) wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen 0.1 bis 0.25 mol ^{14}C -Jodacetamid (2 μCi) per mol Cys (gelöst in Wasser) beige-fügt. Nach 10 min Reaktionszeit wurde eventuell noch vorhandenes Jodacetamid durch Zugabe von 0.5 mol DTE/mol Cys abgefangen. Gleichzeitig sollten damit auch eventuell gebildete Disulfidbrücken reduziert werden. 20 min später wurde das Protein durch Zugabe von 2 Volumina einer gesättigten Lösung von Guanidin-HCl und 40 mM EDTA in 20 mM Tris-HCl ($\text{pH}_{\text{app}} = 8.6$) denaturiert. Mit einem zehnfachen Überschuss von nicht radioaktivem Jodacetamid über die totale Menge an SH-Gruppen wurden alle noch freien Cys carboxyamidomethyliert. 4 Stunden nach der Zugabe des Jodacetamids wurde die Reaktionsmischung über eine Säule mit Sephadex G-25 (4.5 x 80 cm), äquilibriert mit 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, entsalzt. Die Protein enthaltenden radioaktiven Fraktionen wurden gepoolt und lyophilisiert.

7.5 Behandlung von Cd_7 -Metallothionein mit EDTA

Zur Entfernung des schwächer gebundenen Cd-Ions (Nicholson et al., 1986) wurden in einem separaten Ansatz 500 nmol rekonstituiertes Cd_7 -MT in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) aufgelöst und ein 20-facher Überschuss an EDTA beige-fügt. Nach 10 Minuten wurden 0.1 mol ^{14}C -Jodacetamid pro mol Cys zugegeben und das pH durch langsame Zugabe von Tris auf 8.6 erhöht. 10 Minuten später wurde wie unter 7.4 mit DTE das möglicherweise noch vorhandene radioaktive Jodacetamid abgefangen. Das weitere Vorgehen entsprach demjenigen unter 7.4 .



Figur 7.1: (A) HPLC-Auftrennung der Peptide von vollständig mit Jodacetamid modifiziertem MT nach Verdauung mit Trypsin.

Puffer A: 0.1 % TFA, Puffer B: 0.1 % TFA 60 % Acetonitril. Flussgeschwindigkeit 1 ml/min.

(B) Rechromatographie der Peptide 10a und 10b mit dem gleichen Puffersystem.

7.6 Verdauung und Peptid-Fraktionierung

Die lyophilisierten Proben aus 7.4 und 7.5 wurden in 2 ml $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (100 mM) gelöst und mit 5 % (w/w) Trypsin (gelöst in 1 mM HCl) verdaut. Das Trypsin wurde in 5 Schritten nach 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden zugegeben. Zwei Stunden nach der letzten Zugabe wurden die Proben lyophilisiert. Für die Fraktionierung mittels 'reverse phase' HPLC wurde die lyophilisierte Probe in 0.1 % TFA (Puffer A) gelöst und davon ein etwa 200 μg enthaltendes Volumen eingespritzt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min über eine RP 18 Säule (Spheri 10, Brownlee) chromatographiert. Nach 5 min isokratischer Elution wurde mit einem Gradienten von 0 - 25 % (v/v) Puffer B (60 % Acetonitril/0.1 % TFA) in Puffer A während 50 min eluiert (Figur 7.IA, Tabelle 8.II)(Münger et al., 1985). Die Peptidfraktionen wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer eingetrocknet. Fraktion Nr. 10 wurde in 500 μl Puffer A gelöst und mit demselben Puffersystem auf derselben HPLC-Säule rechromatographiert, dabei wurde zuerst mit einem Gradienten über 5 min von 0 - 20 % Puffer B in Puffer A und darauf mit einem Gradienten über 10 min von 20 - 25 % Puffer B in Puffer A eluiert (Figur 7.IB). Diese Fraktionen wurden ebenfalls am Rotationsverdampfer eingetrocknet.

7.7 Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Alle Proben aus 7.6 wurden in 500 μl Wasser gelöst. Davon wurden 50 μl für die Bestimmung der Radioaktivität verwendet. Diese wurden in 10 ml Scintillatorflüssigkeit (Aquashure, New England Nuclear) für 20 min gezählt. Die Peptidkonzentration wurde, nach 14-stündiger Hydrolyse in 6 M HCl unter Luftausschluss bei 110°, mittels automatischer Aminosäureanalyse bestimmt.

Die Streubreite der gemessenen spezifischen Radiaktivitäten wurde aus Vergleichsanalysen ermittelt. Die relative Standardabweichung wurde durch Summation über die Quadrate der relativen Abweichungen vom Mittelwert, der verglichenen spezifischen Radioaktivitäten, berechnet. Die so erhaltene relative Standardabweichung betrug 7 %.

8. RESULTATE

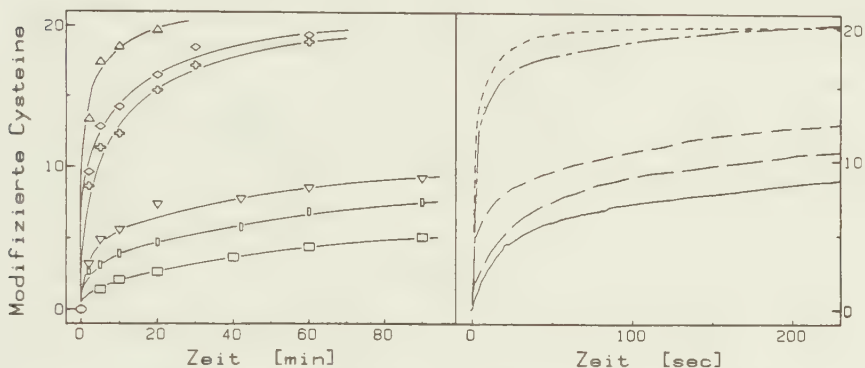
8.1 Kinetik der Modifikation mit Jodacetamid und DTNB

Die Bindung von Cd an Apo-MT²⁾ reduziert die Reaktivität von Cys gegenüber elektrophilen Reagenzien und Oxidationsmitteln. So ist die Reaktionsgeschwindigkeit von Jodacetamid mit Apo-MT 8 mal so gross wie diejenige von Cd₇-MT, und auch die Reaktivität der Cys gegenüber einem 12-fachen molaren Überschuss an DTNB vermindert sich bei vollständiger Besetzung der Metallbindungsstellen mit 7 Cd-Ionen um einen Faktor 5 (Figur 8.I). Auffällig ist dabei, dass von Cd₄-MT zu Cd₅-MT die Reaktionsgeschwindigkeit mit Jodacetamid wie auch mit DTNB stark abnimmt. Diese überproportionale Abnahme ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass mit 5 mol Cd/mol MT bereits eine stabilisierte Struktur gebildet wird.

8.2 Differentielle Modifikation von Cd-Metallothionein

Die starke Reduktion der Reaktivität (Figur 8.I) gegenüber Jodacetamid in Cd₇-MT relativ zu Apo-MT, sowie der Verlauf der Reaktivitätsabnahme, zeigen deutlich, dass der Cd-Gehalt von MT die Reaktivität bestimmt, und dass Jodacetamid ein geeignetes Reagens für die differentielle Modifikation von partiell und vollständig rekonstituierten Cd-MT's ist. Unter Verwendung von ¹⁴C-Jodacetamid wurde dementsprechend nach Unterschieden in der Reaktivität der Cys von MT in Abhängigkeit von deren Besetzung mit Cd gesucht. Zu diesem Zweck wurde Apo-MT und rekonstituiertes MT mit 1 bis 7 mol Cd/mol MT mit einem Unterschuss an ¹⁴C-Jodacetamid

²⁾ In Anbetracht einer Bindungskonstante bei pH 8.6 von $\approx 10^{20}$ (Vasak & Kägi, 1983), kann angenommen werden, dass alles beigegefügte Cd(II) gebunden wird.



Figur 8.1: Einfluss der gebundenen Cd-Ionen auf die Reaktivität der Cys in MT mit Jodacetamid (links) und DTNB (rechts). Die Reaktionsbedingungen sind unter 7.3 beschrieben.

(Δ ,) Apo-MT; ($\diamond$, ----) Cd_2 -MT; ($\oplus$, -.-.-) Cd_4 -MT; (∇ , —) Cd_5 -MT; ($\square$, —) Cd_6 -MT; ($\square$, —) Cd_7 -MT.

(vergl. 7.4) inkubiert und darauf mit einem Überschuss an nichtradioaktivem Jodacetamid vollständig modifiziert. Auf diese Weise wurde chemisch homogen modifiziertes MT erhalten, das mit Trypsin verdaut werden konnte.

Die tryptischen Peptide wurden darauf mittels 'reverse phase' HPLC aufgetrennt (Figur 7.I, Tabelle 8.II). Ausser nach Lys fanden auch Spaltungen der Peptidkette nach den Carboxyamidomethyl-Cysteinresten (CAM-Cys) der Positionen 5 und 15 statt, was zu Peptiden mit den Aminosäuren der Sequenzpositionen 1 - 5, 6 - 15, 1 - 15 führte. Mit Ausnahme des Sequenzstückes der Aminosäuren 16 - 20 konnten alle Peptide identifiziert werden. Die spezifische Radioaktivität von CAM-Cys₁₉ (Cys Nr.5) konnte aber durch Bildung der Differenz der spezifischen Radioaktivitäten der N-terminalen Peptide mit den Aminosäuren Nr. 1 - 20 und 1 - 15 berechnet werden. Für Peptide mit mehreren Cys wurde nur ein Durchschnittswert erhalten. Auf weitere Auflösung mittels Edman-Abbau wurde verzichtet, da frühere Erfahrungen gezeigt haben, dass CAM-Cys-reiche Peptide nur mit grossem Aufwand sauber sequenziert werden können (Kissling, 1979) und die zu erwartende Information in keinem sinnvollen Verhältnis dazu steht.

Tabelle 8.II: Tryptische Peptide von MT-2 aus Kaninchen Leber modifiziert mit Jodacetamid. Die Peptide wurden mittels 'reverse phase' HPLC aufgetrennt (Figur 7.IA und 7.IB).

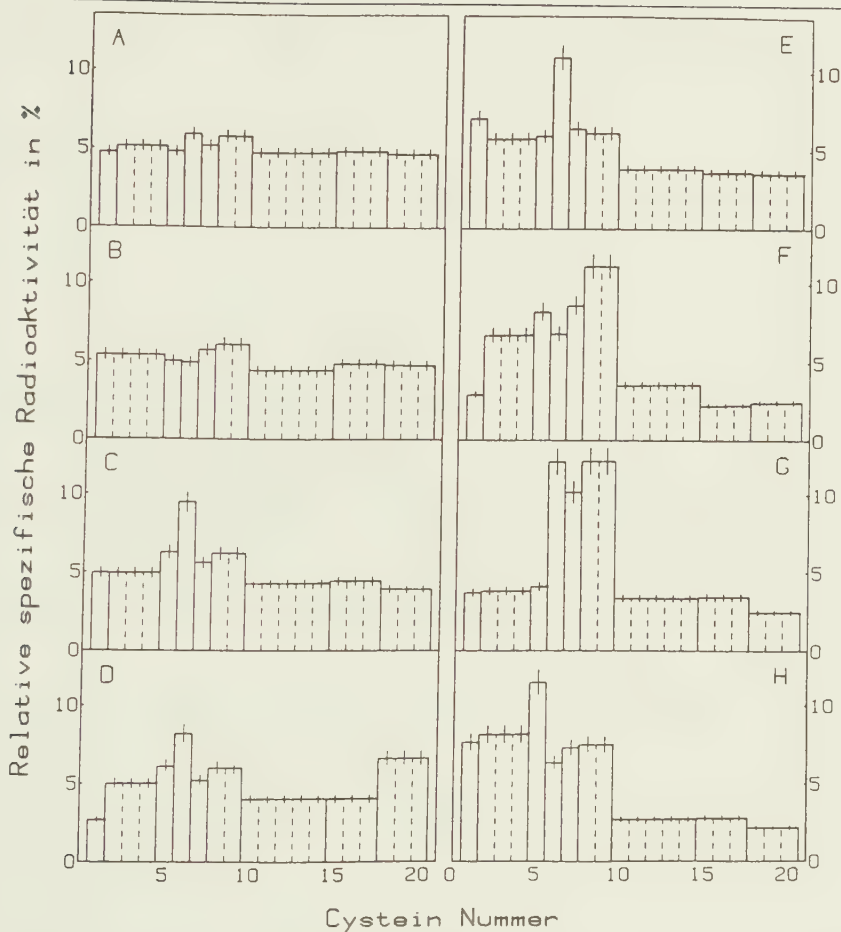
HPLC Peak Nr.	Sequenz- Position	Cystein Nr.	Aminosäuresequenz des Peptids
1	21 - 22	6	CK
2	23 - 25	7	ACK
	52 - 56		GASDK a)
3	26 - 30	8,9	CTSCK b)
4	57 - 61	18-20	CSCCA b)
5	26 - 30	8,9	CTSCK
6	57 - 61	18-20	CSCCA
7	1 - 5	1	MDPNC
8	6 - 15	2-5	SCAADG(SCTC) ^{c)}
9	32 - 43	10-14	SCCSCCPAGCTK
10a	44 - 51	14-17	CAQGCICK
10b	1 - 15	1-4	MDPNCSCAADG(SCTC)
11	1 - 20	1-5	MDPNCSCAADG(SCTCATSC)K

Sequenz von R-LMT-2 in Übereinstimmung mit den gefundenen Peptiden (Kimura, 1979; P. Hunziker, A. Kern, P. Kaur und J.H.R. Kägi, nicht publizierte Resultate).

1 10 20 30
N-Ac-MDPNC/SCAADG(SCTC/ATSC)K/CK/ACK/CTSCK/K/
40 50 60
SCCSCCPAGCTK/CAQGCICK/GASDK/CSCCA

/ zeigt die tryptischen Spaltstellen in carboxyamidomethyliertem R-LMT-2

- a) Dieses Peptid eluiert zusammen mit dem Peptid bestehend aus den Aminosäuren ACK der Sequenzpositionen 23 - 25
- b) Wegen einer nicht identifizierten chemischen Heterogenität eluieren diese Peptide an zwei verschiedenen Positionen im Chromatogramm
- c) Für die in Klammern stehenden Sequenzabschnitte ist nur die Aminosäurezusammensetzung bekannt.



Figur 8. III: Einfluss der Cd-Bindung auf die differentielle Modifikation von partiell und vollständig rekonstituierten Cd-MT's mit ^{14}C -Jodacetamid (Bedingungen vergl. 7.4). Die Histogramme zeigen die relativen spezifischen Radioaktivitäten der Cys, numeriert von 1 - 20, in Prozenten des total eingebauten ^{14}C -Jodacetamids. Falls die tryptischen Peptide 2 oder mehr CAM-Cys enthalten (gestrichelte Unterteilung) wurde der Durchschnittswert angegeben. (A) Apo-MT; (B) Cd_1 -MT; (C) Cd_2 -MT; (D) Cd_3 -MT; (E) Cd_4 -MT; (F) Cd_5 -MT; (G) Cd_6 -MT; (H) Cd_7 -MT.

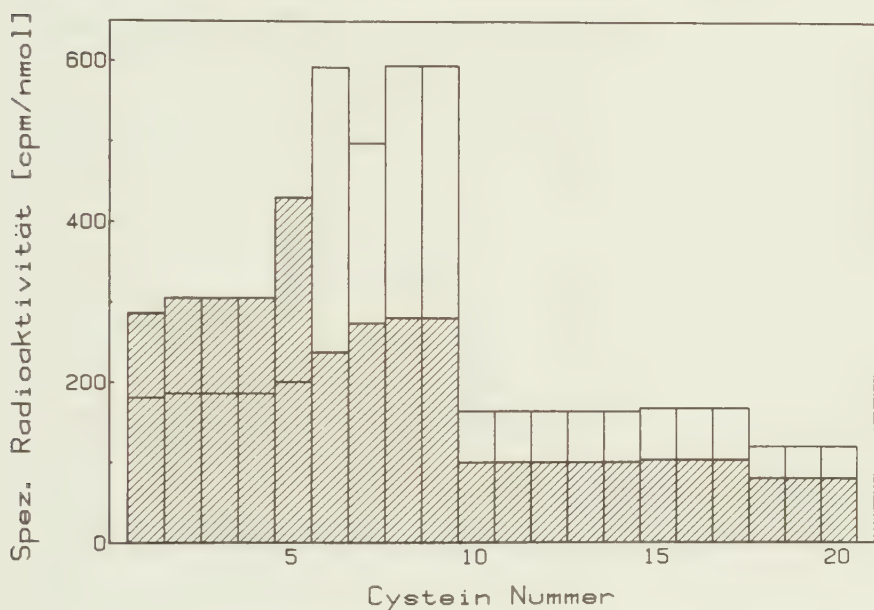
In Figur 8.III sind die relativen spezifischen Radioaktivitäten aus den differentiellen Modifikationen von Apo-MT und Cd_1 - bis Cd_7 -MT zusammengefasst. Dabei bezieht sich 100 % auf die spezifische Radioaktivität des gesamten unverdauten Proteinmoleküls.

In Apo-MT und Cd_1 -MT ist die Radioaktivität im Rahmen der erreichten Genauigkeit ($\approx 7\%$) gleichmässig auf alle 20 Cys verteilt (Figur 8.IIIA und 8.IIIB). Bereits aber mit 2 mol Cd/mol MT und deutlich mit 3 mol Cd/mol MT nimmt die spezifische Radioaktivität der CAM-Cys im mittleren Teil der C-terminalen Hälfte (Aminosäurereste 33 - 51) der Peptidkette ab (Figur 8.IIIC und 8.IIID), was darauf hindeutet, dass diese Cys bedingt durch die Bindung an Cd(II) weniger rasch mit dem zugegebenen ^{14}C -Jodacetamid reagiert haben als die N- und C-terminalen Cys.

In Cd_4 -MT (Figur 8.IIIE) ist die relative spezifische Radioaktivität bei allen Cys der C-terminalen Hälfte gegenüber der N-terminalen verringert und Cd_5 -MT zeigt dasselbe Bild, nur sind die Unterschiede zwischen den beiden Hälften deutlicher ausgeprägt (Figur 8.IIIF). Dazu kommt, dass im N-terminalen Teil die Cys 1 - 5 gegenüber den Cys 6 - 9 eine leicht verringerte Radioaktivität aufweisen. Die niedrigeren relativen Radioaktivitäten am N- und C-Term führen bereits bei Cd_5 -MT zu einer kompensatorischen Zunahme der relativen spezifischen Radioaktivitäten im mittleren Teil der N-terminalen Hälfte der Peptidkette. Dieser Effekt wird in Cd_6 -MT (Figur 8.IIIG) verstärkt sichtbar, wo die Cys am N-Term und in der gesamten C-terminalen Hälfte dreimal weniger rasch mit dem vorhandenen Jodacetamid reagiert haben.

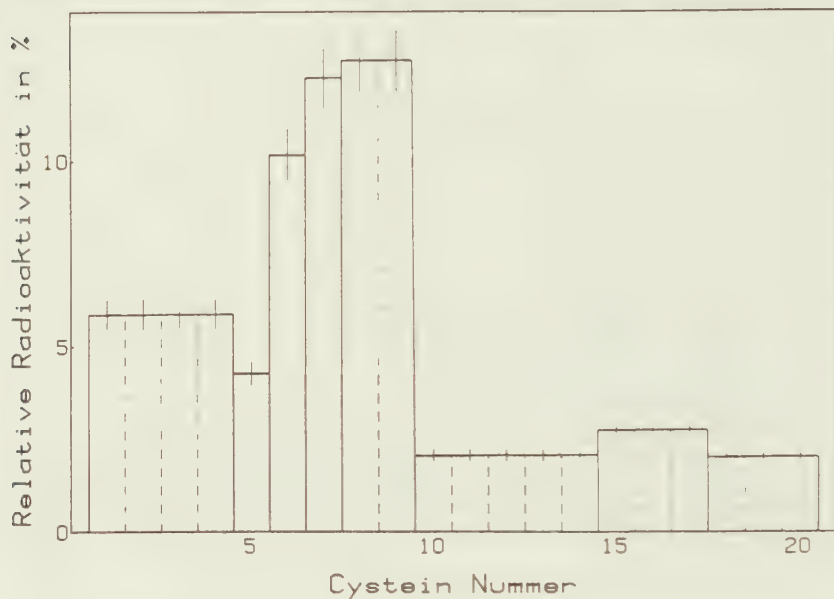
In Cd_7 -MT, welches vollständig mit Cd(II) abgesättigt ist und in dem alle Cys an Cd(II) gebunden sind, besteht ein grosser Unterschied in der Reaktivität gegenüber Jodacetamid zwischen der N- und C-terminalen Hälfte (Figur 8.IIIH), wobei die C-terminalen Cys nur etwa 30 % der spezifischen Radioaktivität der N-terminalen aufweisen. Daraus lässt sich direkt folgern, dass die Thiolat-Liganden des β -Clusters deutlich labiler sind als diejenigen des α -Clusters.

Sehr aufschlussreich ist auch ein Vergleich der absoluten Reaktivitäten. So reagieren mit Cd_5 -MT im Laufe der 10-minütigen Inkubationszeit noch 5 mol Jodacetamid/mol MT, während es bei Cd_7 -MT nur noch 2 mol Jodacetamid/mol MT sind. Die Reaktivität wurde demnach um 60 % reduziert. Diese Reduktion erstreckt sich auf alle Cys. Besonders interessant ist aber, dass



Figur 8.IV: Differentielle Modifikation von Cd_6 -MT und Cd_7 -MT. Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten von Cd_6 - und Cd_7 -MT (Figur 8.III). Auffällig ist die Reduktion der Reaktivitäten der Cys 6 - 9 und der Cys des C-terminalen α -Clusters, sowie die erhöhte Reaktivität am N-Terminus.
 □ Cd_6 -MT; ▨ Cd_7 -MT.

von Cd_6 -MT zu Cd_7 -MT die spezifische Radioaktivität gegenüber den 11 C-terminalen Cys beinahe halbiert wird, während die 5 N-terminalen Cys etwa um die Hälfte reaktiver werden (Figur 8.IV). Daraus folgt, dass bei der Besetzung aller sieben Bindungsstellen die C-terminalen Cys besonders stabilisiert werden. Dies zeigt, dass ein vollständig besetzter β -Cluster sich stabilisierend auf den α -Cluster auswirkt, was wiederum bedeutet, dass Interaktionen zwischen den beiden Cd-Thiolat-Clustern existieren.



Figur 8.V: *Differentielle Modifikation von Cd₇-MT mit Jodacetamid nach Behandlung mit EDTA (vergl. 7.5). Unter den verwendeten Bedingungen wird 1 Cd-Ion aus dem β -Cluster entfernt. Die Aehnlichkeit mit Figur 8.III G ist auffällig. Wie in Figur 8.III ist die relative spezifische Radioaktivität in Prozent des eingebauten ¹⁴C-Jodacetamid angegeben.*

8.3 Identifikation der schwächsten Bindungsstelle

Studien mit Cd₇-MT und EDTA haben in mehreren Arbeitsgruppen (Nicholson et al., 1986)(Garvey, 1984) gezeigt, dass genau ein Cd-Ion durch EDTA entfernbar ist. Da die Methode der differentiellen Modifikation geeignet sein sollte, um die an der Bindung dieses Cd-Ions beteiligten Cys zu identifizieren, wurde sie auf Cd₇-MT angewandt, das den Bedingungen,

beschrieben bei Nicholson et al. (1986) (vergl. 7.5), ausgesetzt war. Wie Figur 8.V zeigt, werden dabei die Cys zwischen den Sequenzpositionen 20 und 30 deutlich stärker modifiziert. Diese Cys sind also durch die Behandlung von $\text{Cd}_7\text{-MT}$ mit EDTA gegenüber radioaktivem Jodacetamid reaktiver geworden. Das erhaltene Profil der relativen spezifischen Radioaktivitäten gleicht demjenigen von $\text{Cd}_6\text{-MT}$ (Figur 8.IIIG).

9. DISKUSSION

9.1 Anwendbarkeit der differentiellen Modifikation

Der Verlauf der Reaktionen von MT mit Jodacetamid und DTNB in Abhängigkeit des Cd/Protein -Verhältnisses demonstriert den starken protektiven Effekt, den die Cd-Ionen auf die Reaktivität der Cys gegenüber Jodacetamid und DTNB haben. Dabei handelt es sich um zwei völlig verschiedene Reaktionstypen, im ersten Fall um eine nucleophile Substitution zweiter Ordnung (SN_2) und im zweiten um eine Redoxreaktion (Disulfidaustausch).

Unter den verwendeten Bedingungen (pH 8.6, Zimmertemperatur) sind etwa 25 % (der durchschnittliche pK_a der Cys von Apo-MT ist 8.9, Vasak & Kägi, 1983) der nicht Cd-gebundenen Cys von MT deprotoniert. Das heisst, die Cys liegen als RS^- , RSH oder RSCd , beziehungsweise als $\text{RS}(\text{Cd})_2$ im Fall von Brückenliganden vor. In derselben Reihenfolge nimmt ebenfalls der nukleophile Charakter des Schwefels ab, da Protonen wie auch Cd(II) Lewis-Säuren sind, und durch Bindung an die Thiolat-Gruppe deren Ladungsdichte vermindern, und dadurch deren Fähigkeit, eine SN_2 -Reaktion einzugehen, herabsetzen. Es ist deshalb anzunehmen, dass es sich bei der Thiolat-Gruppe um die mit Abstand reaktivste Spezies handelt. Diese Annahme wird auch durch die experimentell bestimmte 8-fache Verminderung der Reaktivität von $\text{Cd}_7\text{-MT}$ gegenüber Apo-MT mit Jodacetamid unterstützt (Figur 8.I).

9.2 Kinetik der Modifikationsreaktionen

Der zeitliche Verlauf der Modifikation mit Jodacetamid und DTNB ändert mit zunehmendem Cd-Gehalt von MT in ähnlicher Weise (Figur 8.I). In beiden Fällen ist eine ausgeprägte Reaktivitätsabnahme zwischen Cd_4 - und Cd_5 -MT auffällig. Diese Nichtlinearität der Reaktivität lässt sich am einfachsten durch die Bildung von stabilisierten Teilstrukturen erklären. Insbesondere kann sie die Bildung des C-terminalen Cd_4 -Clusters bedeuten, da bei diesem Cd/Protein-Verhältnis die C-terminalen Cys in stärkerem Masse durch Cd(II) vor der Modifikation mit Jodacetamid geschützt werden (Figur 8.III E). Diese Clusterbildung führt zur Entstehung von Thiolat-Brückenliganden, die zwei Cd(II) gleichzeitig komplexieren. Solcherart vernetzte Strukturen führen aber zu Einschränkungen in der intramolekularen Beweglichkeit und reduzieren damit den Austausch von Thiolat-Liganden und damit die möglichen Kontakte mit dem modifizierenden Reagens, was in einer verminderten Reaktivität der beteiligten Cys zum Ausdruck kommt.

Diese Vorstellung wird auch durch Untersuchungen an Co(II)-MT gestützt. Bei gleichem pH und sehr ähnlichen Bedingungen findet bei etwa 4 mol Co/mol MT auch in Co(II)-MT der Übergang von mononukleären zu polynukleären Co-Thiolat-Komplexen statt, was bei zunehmender Anzahl gebundener paramagnetischer Co(II) zu einer Abnahme der magnetischen Suszeptibilität durch die Kopplungen des Spins benachbarter Metallionen führt (Vasak et al., 1981). Ebenso zeigen die CD-Spektren von Cd- und Hg-MT (bei pH 8.6) ab 4 mol Me/mol MT excitonische Kopplung, was auf die Bildung von vernetzten Strukturen zurückzuführen ist (Willner, 1986) (vergl. 4.2, 5.2).

9.3 Der Aufbau von Cd-Metallothionein

Die differentielle Modifikation von Apo-MT mit Jodacetamid ergab innerhalb der experimentellen Genauigkeit für alle Cys eine ungefähr gleiche Reaktivität (Figur 8.III A). Daraus lässt sich schliessen, dass alle Cys ungefähr gleich stark dem alkylierenden Reagens ausgesetzt sind und deren pK_a -Werte ähnlich sind. Dies stimmt auch gut mit ^1H -NMR Messungen überein.

rein, welche zeigen, dass in Apo-MT alle Peptid-Protonen rasch mit D_2O , respektive H_2O austauschen. (Vasak et al., 1980). Beide Resultate zeigen, dass Apo-MT keine fixierte Sekundär- oder Tertiär-Struktur aufweist. Ein vergleichbares Ergebnis erhält man auch bei der differentiellen Modifikation von Cd_1 -MT und Cd_2 -MT (Figur 8.IIIB und 8.IIIC). Dies ist damit zu erklären, dass zugegebene $Cd(II)$ nicht an bestimmte Stellen von MT binden, sondern in freier Kombination Komplexe mit beliebigen Cys eingehen können.

Erst ab 3 mol Cd/mol MT zeigt die Verteilung der relativen Radioaktivitäten Unterschiede zwischen den einzelnen Cys (Figur 8.IIID). Eine niedrigere Reaktivität der Cys zwischen den Sequenzpositionen 33 und 50 (Cys Nr. 10 - 17) zeigt, dass $Cd(II)$ jetzt bevorzugt an diesen cystein-reichen Teil der Peptidkette gebunden wird. Die geringen Unterschiede deuten jedoch weiterhin auf frei austauschbare Bindungen hin.

Mit 4 mol Cd/mol MT wird das Bild etwas klarer (Figur 8.IIIE). Bei dieser Stöchiometrie sind nun alle Cys des C-terminalen α -Clusters deutlich weniger reaktiv als diejenigen des N-terminalen β -Clusters. Mit Cd_5 -MT erhält man prinzipiell dieselbe Verteilung der relativen Reaktivitäten, nur sind die Unterschiede noch etwas deutlicher ausgeprägt (Figur 8.IIIF). Daraus und aus Resultaten der kinetischen Studien (vergl. 8.1, 9.2) darf geschlossen werden, dass jetzt inerte Strukturen existieren, d.h. dass der α -Cluster ausgebildet wird.

Werden die Profile für Cd_5 -MT und Cd_6 -MT miteinander verglichen (Figur 8.IIIF und 8.IIIG), so wird deutlich, dass die Besetzung des β -Clusters vom N-Term her erfolgt, sind doch bereits bei Cd_5 -MT die N-terminalen Cys deutlich weniger reaktiv als diejenigen gegen die Mitte der Sequenz. Mit 6 mol Cd/mol MT erhält man massivere Unterschiede in der spezifischen Radioaktivität. Der fünffache Reaktivitätsunterschied zeigt, dass Cd_6 -MT bereits eine stabile Struktur besitzt, in der der freie Austausch von Thiolat-Liganden deutlich erschwert ist.

9.4 Thermodynamische Überlegungen

Unter der Annahme, dass jede rekonstituierte Spezies im Gleichgewicht vorliegt und dass Jodacetamid hauptsächlich mit freien Thiolat-Gruppen reagiert, widerspiegelt die Folge der differentiellen Modifikationen von Apo-MT bis Holo-MT auch thermodynamische Aspekte der Cd-Bindung. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Metall-Thiolat-Bindungen labil sind und ein Rearrangement der Cd-Cys-Bindung rasch erfolgt, eine Annahme, die auch in den ^{113}Cd -NMR Untersuchungen von Vasak (1985) und Nettesheim et al. (1985) durch den Nachweis, dass Cd(II) zwischen einzelnen Bindungsstellen in MT ausgetauscht wird, unterstützt wird. Eine weitere Voraussetzung für thermodynamische Schlussfolgerungen ist die Forderung, dass die Modifikationsreaktion über einen SN_2 -Mechanismus verläuft.

Werden die Daten von Figur 8.III mit Hilfe dieser plausiblen Annahmen interpretiert, so wird die Reaktivität der Cys direkt vom Grad der Bindung an Cd(II) abhängig. Die durchgeführten differentiellen Modifikationsexperimente zeigen nun, dass Cd(II) zuerst im C-terminalen α -Cluster bindet und dort stärker gebunden wird, als im N-terminalen β -Cluster. Dies zeigt sich insbesondere darin, dass die Abnahme der spezifischen Radioaktivitäten in der C-terminalen Hälfte schon bei niedrigen Cd/Protein-Verhältnissen einsetzt. Dieses Resultat stimmt auch gut überein mit den Vermutungen von Nielson & Winge (1983), sowie mit CD-spektroskopischen und potentiometrischen Daten (Willner, 1986; Vasak und Kägi, 1983; Gilg, 1985).

Die Ähnlichkeit der Reaktivitätsprofile von Cd_6 -MT und von mit EDTA behandeltem Cd_7 -MT unterstützt ebenfalls diese thermodynamische Interpretation, wird doch durch EDTA das am schwächsten gebundene Cd(II) aus dem vollständig besetzten Cd_7 -MT herausgelöst. Damit werden aber die gleichen Cys reaktiver, die auch in Cd_6 -MT durch ihre Reaktivität hervorstechen. Eine eindeutige Identifizierung der genauen Position der dieses Cd(II) bindenden Cys ist aus diesem Experiment jedoch nicht möglich, da eine Neuverteilung der Liganden auf die restlichen zwei Cd-Ionen des β -Clusters nicht auszuschliessen ist und ^{113}Cd -NMR Untersuchungen zeigen, dass diese Cd-Ionen sehr beweglich sind (Nettesheim et al., 1986). Auf jeden Fall aber ist das am schwächsten gebundene Cd(II) dem β -Cluster zuzuordnen.

Betrachtet man den gesamten Rekonstitutionsvorgang des Cd-MT's von Cd₁-MT zu Cd₇-MT, so findet man, dass die Bildung der beiden Cd-Thiolat-Cluster ein in mehreren Schritten ablaufender, komplizierter Prozess ist. Bei niedrigen Cd/Protein-Verhältnissen wird Cd(II) bevorzugt in mononukleären Komplexen über vier terminale Thiolat-Liganden an das Protein gebunden. Erst mit 4 mol Cd/mol MT tritt die Clusterbildung klar in den Vordergrund. Auf jeden Fall ist die strikte Kooperativität, welche Nielson und Winge (1983) postulierten (vergl. 6.3) nicht zu finden. Eine gewisse Kooperativität ist aber in dem Sinne vorhanden, dass bei zunehmender Cd-Konzentration sich die Tendenz zur Clusterbildung in der C-terminalen Hälfte bis zu Cd₅-MT progressiv verstärkt.

Andererseits kann auf Grund des schwächer gebundenen siebten Cd-Ions von Antikooperativität bei der Bildung des β -Clusters gesprochen werden. Diese Antikooperativität sowie die niedrigere Bindungsstärke sind vermutlich dadurch bedingt, dass ein Teil der Bindungsenergie dieses Ions für die Destabilisierung der bereits vorhandenen Cd-Thiolat-Komplexe am N-Term aufgewendet werden muss (Figur 8.IV).

Interpretiert man das Reaktivitätsprofil von Cd₇-MT in der gleichen Weise, so folgt, dass die Cys des β -Clusters ungefähr 3 mal stärker reagieren und dementsprechend 3 mal weniger mit Cd(II) komplexiert sind als diejenigen des α -Clusters. Dies entspricht einem durchschnittlichen Unterschied in der freien Enthalpie der einzelnen Cd-Thiolat-Bindung (ΔG_S) in den beiden Clustern von:

$$\Delta G_S = RT \ln \frac{K_{S\alpha}}{K_{S\beta}} = 8.31 \times 298 \ln 3 = 2.7 \text{ kJ/mol}$$

wo $K_{S\alpha}$ und $K_{S\beta}$ die entsprechenden Bindungskonstanten sind.

Da auf jedes Cd(II) im Durchschnitt etwa 3 Thiolat-Liganden fallen, führt dies zu einer um 8.2 kJ/mol (ΔG_{Cd}) höheren durchschnittlichen Bindungsenergie für Cd(II) im α -Cluster ($K_{Cd\alpha}$) gegenüber dem entsprechenden Wert im β -Cluster ($K_{Cd\beta}$). Dies wiederum ergibt als Verhältnis der Bindungskonstanten ausgedrückt:

$$\frac{K_{Cd\alpha}}{K_{Cd\beta}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{Cd}}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{8200}{8.31 \cdot 298}\right) \approx 30$$

Dieses Ergebnis bedeutet, dass Cd(II) im α -Cluster ≈ 30 mal stärker gebunden wird als diejenigen des β -Clusters. Bei dieser Rechnung handelt es sich nur um eine grobe Schätzung. Trotzdem ist die Übereinstimmung mit dem aus potentiometrischen Untersuchungen (Vasak und Kägi, 1983) geschätzte Verhältnis der Bindungskonstanten ($K_{Cd\alpha}/K_{Cd\beta}$) von 40 erstaunlich gut.

9.5 Vergleich mit anderen Schwermetallionen

Die vorliegenden Resultate zeigten, dass Cd(II) bei niedrigen Cd/Protein-Verhältnissen, zufällige Komplexe mit Thiolat-Liganden eingehen, und dass sie mit dem Anwachsen dieses Verhältnisses zunehmend, fixierte oligonukleäre Strukturen bilden. Während Zn(II) und Hg(II) und Co(II) auf Grund von differentiellen Modifikationsexperimenten (Blum, 1986) und spektroskopischen Daten (diese Arbeit, I. Teil; Vasak & Kägi, 1981) in ähnlicher Art und Weise in MT eingebaut werden, ist zur Zeit noch offen, ob dies auch für weitere, an MT gebundene Metallionen gilt, insbesondere für Cu(I) und Ag(I), die mit einer anderen Koordinationsgeometrie an die Thiolatgruppen von MT gebunden zu werden scheinen.

III. TEIL

ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG VON Cd-BINDENDEN POLYPEPTIDEN AUS MAIS-WURZELN

10. EINLEITUNG

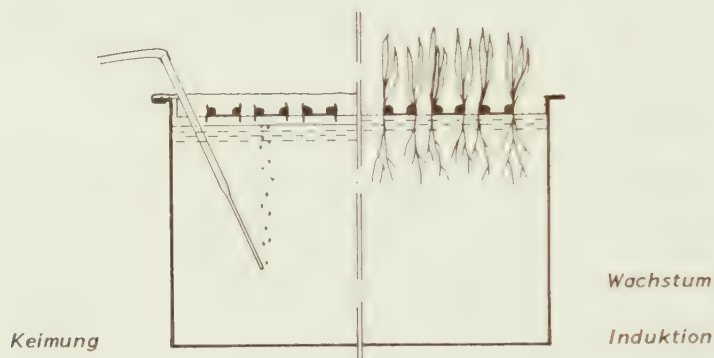
10.1 Ausgangslage und Zielsetzungen

Bis zum Beginn dieser Arbeit (Nov. 1984) wurde in einigen Publikationen über Cd-bindende Proteine in Pflanzen und Hefe berichtet (vergl. Einführung). Diese polypeptidischen Verbindungen zeigten alle eine Aminosäurezusammensetzung mit Glutaminsäure und Cystein in einem ungefähren Verhältnis von 1:1 sowie mit kleinen Mengen Glycin. Oft war, wegen mangelnder Reinheit und Homogenität der Präparate, nicht zu entscheiden, ob noch andere Aminosäuren wie Histidin, Asparaginsäure und Serin vorkommen. Weiter herrschte Unklarheit über deren Molekulargewicht und Cd-Bindungseigenschaften.

Die Präparation dieser Polypeptide aus Pflanzen ist ausserordentlich schwierig, da in Gegenwart von Cd grosse Mengen phenolartiger Verbindungen mitinduziert werden und diese Stoffe sich nur schwer abtrennen lassen, zudem scheinen sie sich während der Präparation an der Oxidation der Cd koordinierenden Thiolat-Gruppen zu Cystin zu beteiligen. Auf Grund dieser Probleme ist es bisher nicht gelungen, diese Polypeptide aus Pflanzen in reiner Form darzustellen. Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, diese in nativer Form aus Pflanzen zu gewinnen und zu charakterisieren, damit in einer späteren Arbeit die Struktur erarbeitet werden kann. Als Bezeichnung für diese Cd-bindenden Polypeptide wurde der von Grill et al. (1985) geprägte Name 'Phytochelatin' übernommen.

11. MATERIALIEN UND METHODEN

11.1 Maissorte und Zuchtbedingungen



Figur 11.I: Keimung und Wachstum von Mais, sowie Induktion von Phytochelatin. Nach 3 Tagen Keimung im Dunkeln und 7 Tagen Wachstum wurde Phytochelatin während 7 Tagen mit $30 \mu\text{M Cd(NO}_3)_2$ im Medium induziert.

Alle Arbeiten wurden mit ungebeiztem Hybrid-Saatmais "Blizzard G-188" von Ciba-Geigy durchgeführt. Vor der Aussaat wurden die Maiskörner eine halbe Stunde in entionisiertes Wasser gelegt. Bei der Aussaat wurden die Körner in Reihen nahe beieinander auf ein Gitter gelegt, mit dem Keimling gegen mit Medium befeuchtete Gazestreifen. Darauf wurde das Gefäß bis 1 cm unter das Gitter (Figur 11.I) mit Medium 1 (Tabelle 11.II) gefüllt und mit Pressluft belüftet. Während der Keimung wurde das Gefäß mit Alufolie abgedeckt. Nach 3 Tagen wurde diese entfernt und mit entionisiertem Was-

Tabelle 11.II: Medien für Keimung und Wachstum (Medium I) sowie für die Induktion von Phytochelatin mit Cd (Medium II). Die Medien wurden nach Hoagland (1938) mit entionisiertem Wasser und purum Chemikalien hergestellt. Die molaren Angaben beziehen sich auf das Formelgewicht.

Substanz	Medium I [μ M]	Medium II [μ M]
KNO_3	750	3000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	500	2000
MgSO_4	250	1000
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	125	500
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	5	20
CuSO_4	0.08	0.32
MnCl_2	2.3	9.2
CoCl_2	0.28	1.1
NaBO_2	11.5	46
ZnCl_2	0.19	0.76
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$		30

ser bis zum Gitter aufgefüllt. Nach 7 Tagen Wachstum wurde das Medium gewechselt und mit 30 μ M Cd versehen (Medium II, Tabelle 11.II) und nach weiteren 7 Tagen wurden die Wurzeln geerntet. Um schnelleres Wachstum zu erreichen wurde der Raum während 24 h beleuchtet.

11.2 Ernte und Lagerung der Maiswurzeln

Die Maiswurzeln wurden entlang des Gitters abgeschnitten und in Wasser gewaschen. Vor dem Trocknen mit Küchenpapier wurden die Wurzeln möglichst gut ausgerungen. Die abgetrockneten Wurzeln wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Pistill zerstampft. Die so zerkleinerten Wurzeln können längere Zeit bei -20° aufbewahrt werden.

11.3 Aufschluss und Extraktion

Bei diesen Arbeitsgängen wurde darauf geachtet, dass möglichst O_2 -frei gearbeitet wurde. Vor der Zugabe von Ascorbinsäure und Thioharnstoff wurden alle Puffer entgast und mit N_2 gesättigt. β -Mercaptoäthanol und

Tabelle 11.III: Zusammensetzung der für die Präparation benötigten Puffer

Substanz	Extraktions- Puffer [mM]	Elutions- Puffer [mM]	Grenzpuffer [mM]
Tris	100	100	100
HCl	20	20	20
KCl	100	100	2000
Ascorbinsäure	5	5	5
Thioharnstoff	5	5	5
β -Mercaptoäthanol	5		
KCN	1		

KCN wurden dem Extraktionspuffer etwa 1 h vor Gebrauch zugefügt.

Als erstes wurden etwa 150 g gefrorene und zerstampfte Wurzeln im Waring Blender in flüssigem N_2 zu Pulver zermahlen und in ein Pulverglas mit luftdichtem Deckel gefüllt. Nach Zugabe von 150 ml Extraktionspuffer (Tabelle 11.III) wurde der Deckel nur leicht aufgelegt. Sobald keine Dämpfe mehr entweichen, wurde das Glas geschlossen und unter kräftigem Schütteln wurde der gefrorene Inhalt in ungefähr 50° warmem Wasser aufgetaut. Sobald keine Eisklumpen mehr vorhanden waren, wurde alles durch 4-fach zusammengefaltete Gase filtriert und mit 50 ml Extraktionspuffer nachgespült. Das Filtrat wurde für 6 min bei 50'000 g (20'000 rpm, SS 34) zentrifugiert.

11.4 Ionentauscherchromatographie über QAE-Sephadex

QAE-Sephadex A-25 wurde in bidestilliertem Wasser bei 4° (24 h) gequollen und in eine Säule von 1.4 x 10 cm abgefüllt. Diese wurde unter O₂-Ausschluss über Nacht mit O₂-freiem Elutionspuffer (Tabelle 11.III) äquilibriert (30 ml/h). Die Chromatographie erfolgt unter N₂ bei 4°. Der Extrakt aus 11.3 wurde unter O₂-Ausschluss auf die Säule gepumpt (80 ml/h) und die Säule wurde während 2 h mit 80 ml/h und darauf während 2 h mit 40 ml/h mit Elutionspuffer gespült. Mit einem linearen Salzgradienten von je 250 ml Elutions- und Limitpuffer (Tabelle 11.III) wurde das Cd-binde Material mit 30 ml/h eluiert. Die Cd-haltigen Fraktionen wurden gesammelt (≈ 150 ml) und mit einem Ultrafilter (Amicon, YM 2 Membran) mit einem 'cut off' von $M_r = 2000$ auf etwa 10 ml eingengt und ohne Entsalzen lyophilisiert.

11.5 Gelfiltration über Sephadex G-50

Das Lyophilisat aus 11.4 wurde in 3 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) aufgelöst und über eine Säule (2.5 x 150 cm) mit Sephadex G-50, äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.6), bei 4° chromatographiert (14 ml/h). Die beiden Cd-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und lyophilisiert.

11.6 Pyridyläthylierung

Die folgende Modifikation fand in einer N₂-gespülten Glovebox bei Zimmertemperatur statt. Alle Lösungen wurden entgast (vergl. 7.2). Das Lyophilisat aus 11.5 wurde in 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) gelöst und 3 Volumina gesättigtes Guanidin-HCl mit 40 mM EDTA (pH 8.6), sowie 8 mol DTE/mol Cd (in Wasser gelöst) zugegeben. 30 min später wurde ein 10-facher Überschuss an Vinylpyridin über die SH-Gruppen von DTE beigelegt. Nach 3 h wurde das ganze Reaktionsgemisch über eine Säule (2.5 x 100 cm, 6 ml Auftragevolumen) mit Sephadex G-10, äquilibriert mit 50 mM Essigsäure,

entsalzt. Die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht wurde gepoolt und lyophilisiert (Kissling, 1979).

11.7 Fraktionelle Modifikation von Phytochelatin

Die folgende Modifikation fand in einer N₂-gespülten Glovebox bei Zimmertemperatur statt. Alle Lösungen wurden entgast (vergl. 7.2). Lyophilisate der beiden Fraktionen aus 11.5 (je 10 µmol Cd) wurden in 1 ml Tris-HCl (pH 8.6) gelöst und mit 3 ml gesättigtem Guanidin-HCl/40 mM EDTA (pH 8.6) sowie 5 µCi ¹⁴C-Jodacetamid (53 µCi/µmol) inkubiert. Nach 30 min wurden 200 µmol Jodacetamid in Wasser gelöst zugegeben (Endvolumen 5 ml). Nach 3 h wurde über eine Säule (2.5 x 100 cm) mit Sephadex G-10, äquilibriert mit 20 mM (NH₄)HCO₃, entsalzt. Die radioaktive hochmolekulare Fraktion wurde gepoolt und lyophilisiert. Für die folgende Pyridyläthylie- rung wurde die Hälfte des Lyophilisats in 1 ml Wasser gelöst und mit 20 µmol DTE und 200 µl Triäthylamin für 2 h inkubiert. Darauf wurde 300 µl Vinylpyridin zugegeben und nach 3 h wie in Abschnitt 11.6 entsalzt und lyophilisiert.

11.8 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure wurden die carboxyamido- methylierten Peptide, die vorgängig mittels 'reverse phase' HPLC gereinigt worden waren, verwendet. Dazu wurden etwa 1 mg dieser Peptide auf eine RP 18 Säule (Brownlee, Spheri 10) aufgetragen und isokratisch mit 0.1 % TFA mit 1 ml/min eluiert. Die ersten 3 ml des Eluats wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer eingetrocknet. Darauf wurde nach der Methode von DeJong et al. (1982) mit Dansylchlorid die N-terminale Aminosäure markiert und identifiziert.

11.9 Fraktionierung der Pyridyläthyl-Derivate

Die pyridyläthylierten Peptide wurden mittels 'reverse phase' HPLC aufgetrennt. Dabei wurden 0.01 bis 0.2 mg dieser Peptide in 50 - 100 µl Wasser oder Puffer A (0.1 % TFA) gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach 5 min isokratischer Elution wurde mit einem Gradienten mit einer Steilheit von 2 % Puffer B (0.1 % TFA/60 % Acetonitril) pro min in Puffer A eluiert.

Die Rechromatographie erfolgte mit derselben Säule, dabei wurde nach 5 min isokratischer Elution zuerst ein Gradient von 0 - 20 % Puffer B in Puffer A während 5 min angelegt, gefolgt von einem Gradienten mit einer Steigung von 0.75 % Puffer B pro min in Puffer A.

Alle Trennungen erfolgten auf einer 'reverse phase' Säule (RP 18, Spheri 10) von Brownlee (Santa Clara, CA, USA) mit einer Porengrösse von 100 nm (10 µm Partikelgrösse). Die Detektion der pyridyläthylierten Peptide erfolgte bei 254 nm mit einem Photometer, welches mit einer 100 µl Durchflussszelle ausgerüstet war.

11.10 Aminosäureanalysen

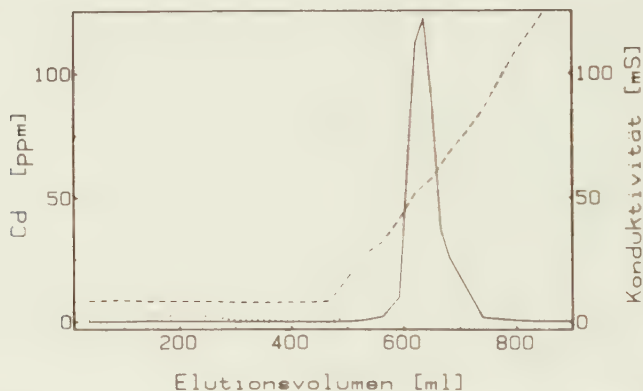
Für die Aminosäureanalysen wurden die Cystein zu CySO_3H (Vorschrift siehe 3.4), CAM-Cystein oder Pyridyläthylcystein (siehe oben) modifiziert. In allen Fällen wurde während 14 h bei 110° unter Luftausschluss mit 6 M HCl hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Proben am Rotationsverdampfer eingetrocknet und eine etwa 10 nmol Cystein enthaltende Menge auf den Analysator (Durrum D-500) aufgetragen.

Zur Bestimmung des Farbwertes von Pyridyläthylcystein wurde Glutathion nach der Vorschrift von 11.7 pyridyläthyliert, und 10 nmol auf den Analysator aufgetragen. Pyridyläthylcystein eluierte zwischen Lysin und Ammoniak und der bestimmte Farbwert betrug 78 % desjenigen von Glycin. Für CM-Cystein wurde 90 % des Farbwertes von Asparaginsäure angenommen (Glazer et al., 1975; S. 24)

12. RESULTATE

12.1 Extraktion und Chromatographie

Wie Figur 12.I zeigt, wurde 99 % des aufgetragenen Cd auf der Säule an QAE-Sephadex gebunden und nur während dem Aufpumpen des Extraktes

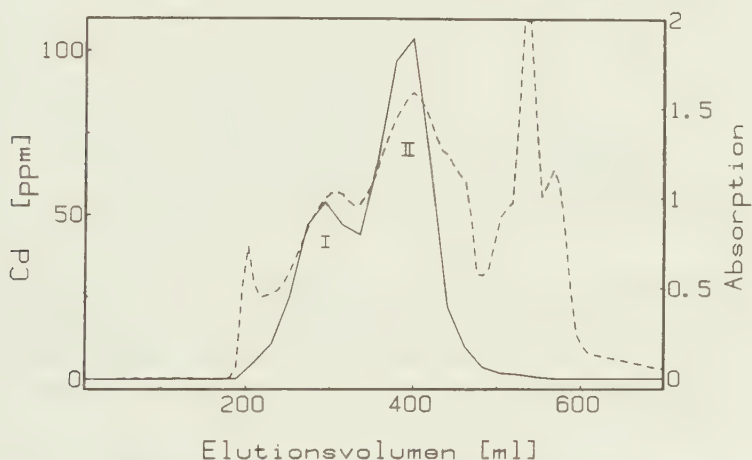


Figur 12.I: QAE-Sephadex Elution des Wurzelextraktes. Nach dem Auftragen wird für 5 h mit Elutionspuffer gespült, dann mit einem linearen Gradienten aus Elutionspuffer und 2 M KCl enthaltendem Elutionspuffer. Mehr als 95 % des extrahierten Cd eluiert mit der Hauptfraktion, was bedeutet, dass keine weitere Cd-bindende Spezies existiert, und die Thiolat-Gruppen erhalten bleiben. (—) Cd, (.....) Cd x 10, (----) Konduktivität

erschieden kleine Mengen im Eluat. Wegen des Thioharnstoff-Gehaltes (5 mM) von Elutions- und Grenzpuffer (Tabelle 11.II) ist es nicht möglich, die Absorption des Eluates bei 254 nm, wo die Cd-bindenden Komplexe absorbieren, zu verfolgen. Es zeigt sich jedoch beim Betrachten der Fraktionen, dass bereits zu Beginn des KCl-Gradienten grössere Mengen von kontaminierenden Polyphenolen abgetrennt werden. Bei einer Konduktivität von etwa 50 mS ($\approx$ 800 mM KCl) eluiert Phytochelatin in einem schmalen Peak

(≈ 150 ml). Im gesammelten Pool befinden sich zwischen 90 und 97 % des aufgetragenen Cadmiums und während der folgenden Konzentrierung durch Ultrafiltration beträgt der Verlust an Cadmium etwa 2 % der ursprünglich im Extrakt vorhandenen Menge.

Bei der Gelfiltration des nach Ionentauscher-Chromatographie erhaltenen lyophilisierten Konzentrats zeigt sich, dass ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von über 20'000 abgetrennt wird (Figur 12.II). Als nächstes eluiert Phytochelatin in zwei unvollständig aufgelösten Peaks (Komplex I und Komplex II) mit apparenten Molekulargewichten von 7-9000 und 3-4000.



Figur 12.II: Gelfiltration über Sephadex G-50 (Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.6). Auftrennung in 2 Spezies mit Molekulargewichten von etwa 8000 (Komplex I) und 3500 (Komplex II). (—) Cd, (----) E₂₅₄

Der grösste Teil der braunen kontaminierenden Substanzen eluiert mit dem Salzvolumen der Säule oder später. Ein kleiner Teil dieser Polyphenole bleibt aber mit den Cd-bindenden Spezies assoziiert.

Mehr als 95 % der aus dem Eluat des Ionentauschers nach saurer Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren entfallen auf Glutaminsäure, Cystein und Glycin in einem Verhältnis von 10 : 10 : 1. Daneben enthält das Hydrolysat

kleine Mengen an Serin und Asparaginsäure. Das Cys/Cd-Verhältnis beträgt auf dieser Stufe zwischen 3.5 und 4 . Die Aminosäurezusammensetzung von Komplex I und Komplex II sowie deren Cys/Cd-Verhältnis ist in Tabelle

Tabelle 12.III Aminosäurezusammensetzung und Cys/Cd-Verhältnis in den aufgetrennten Fraktionen nach Gelfiltration des über QAE-Sephadex gereinigten Phytochelatins.

Phytochelatin	Glu ^{c)}	Cys ^{a)}	Gly ^{b)}	Cys/Cd
Komplex I	8.4	7.8	1	2.9
Komplex II	7.7	6.9	1	4.2

a) Cystein wurde als Cysteinsäure bestimmt

b) alle Werte wurden auf 1 Gly normiert

c) ohne pyridyläthyliertes N-terminales Glu

12.III dargestellt. Neben Glutaminsäure, Cystein und Glycin sind andere Aminosäuren kaum nachweisbar. Die Lösungen sind jedoch noch deutlich rotbraun, enthalten also Polyphenole. Weitere Versuche, diese zu entfernen, führten bisher nicht zum Erfolg, da dabei durch Oxidation und Verlust von Cd die native Struktur der Komplexe verändert wird.

12.2 Pyridyläthylierung, Carboxyamidomethylierung und Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Mit der Entfernung der Cd-Ionen vom Protein geht die Möglichkeit, Phytochelatin auf einfache Art und Weise nachzuweisen, verloren, deshalb muss bei der Carboxyamidomethylierung radioaktives Jodacetamid verwendet werden. Wird diese Modifikation ohne vorgängige Reduktion durchgeführt, so erhält man eine Mischung von Produkten, die mittels 'reverse phase' HPLC nicht aufgetrennt werden kann. Bei vorheriger Reduktion mit DTE hingegen

ist die Hydrophobizität der entstehenden Produkte gering, so dass diese kaum mehr mit der stationären HPLC-Phase interagieren. Weiter zeigt sich, dass nach der Reduktion mit DTE das Molekulargewicht der Produkte so klein ist, dass diese mittels Gelfiltration über Sephadex G-25 nicht mehr entsalzt werden können. Da dieses Säulenmaterial Peptide mit einem Molekulargewicht von mehr als 2000 von niedermolekularen Substanzen zu trennen vermag, handelt es sich bei den Cd-bindenden Komplexen um oligomere Aggregate, die aus mehreren Peptidketten mit einem Molekulargewicht von ≤ 2000 bestehen, welche über Disulfidbrücken miteinander quervernetzt sind.

Erstaunlicherweise war beim carboxyamidomethylierten Material ein grosser Teil der vorhandenen Polyphenole schon bei der auf die Modifikation folgenden Entsatzung über Sephadex G-10 abtrennbar. Reduziertes und carboxyamidomethyliertes Phytochelatin, welches zusätzlich noch mittels 'reverse phase' HPLC gereinigt worden war, erlaubte deshalb die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure. Dazu wurde diese mit Dansylchlorid markiert und nach der darauf folgenden sauren Hydrolyse mittels HPLC (vergl. 11.8) identifiziert. Als einziges Produkt wurden 1.3 mol Dns-Glutaminsäure pro mol Glycin gefunden.

Vor der Modifikation mit Vinylpyridin wurde Phytochelatin in jedem Fall mit DTE reduziert. Bei der darauf folgenden Entsatzung über Sephadex G-10 können nahezu alle Polyphenole abgetrennt werden, so dass nur noch konzentrierte Lösungen der pyridyläthylierten Peptide eine leicht braune Färbung aufweisen. Dieses Derivat von Phytochelatin ist bei jedem pH gut wasserlöslich und zeigt eine Absorptionsbande bei 254 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von etwa $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pro Pyridyläthyl-Gruppe. Dank dieser Eigenschaft lassen sich die pyridyläthylierten Peptide gut nachweisen und rasch quantifizieren, sofern ihre Aminosäurezusammensetzung bekannt ist. Da die N-terminale Amino-Gruppe ebenfalls mit Vinylpyridin reagiert, fehlt die N-terminale Aminosäure in der Aminosäureanalyse. Aus diesem Grunde zeigen alle Aminosäureanalysen von pyridyläthyliertem Phytochelatin, bezogen auf den Glycin-Gehalt, einen um etwas mehr als ein Äquivalent verringerten Glutaminsäuregehalt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die N-terminale Aminosäure aller in der Mischung enthaltenen Peptide Glutaminsäure oder Glutamin ist.

Tabelle 12.IV: Aminosäurezusammensetzung, Anteil Disulfide und Thiol/Cd-Verhältnis der Fraktionen I und II nach Chromatographie über Sephadex G-50

Komplex	Gly ^{a)}	Glu ^{d)}	Disulfid ^{c)}		Thiol ^{b)}	Thiol/ Cd
			Cys	Cys	Cys	
I ^{e)}	1	7.9	5.9	2.1	3.7	1.9
II ^{f)}	1	7.7	7.1	4.1	3.1	1.8

a) alle Daten sind auf ein Gly normiert

b) bestimmt nach Carboxyamidomethylierung ohne vorherige Reduktion

c) bestimmt nach Pyridyläthylierung von mit DTE reduziertem, carboxyamidomethyliertem Material

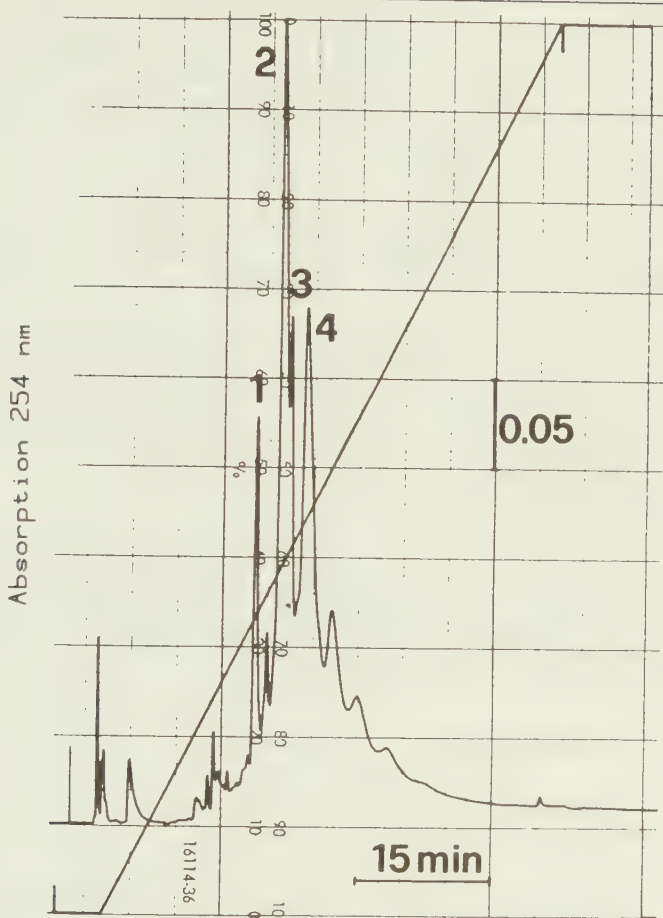
d) ohne pyridyläthylirtes N-terminales Glutaminsäure

e) M_r 7 - 9000

f) M_r 3 - 4000

12.3 Fraktionelle Modifikation mit Jodacetamid und Vinylpyridin

Nach den Erfahrungen mit der Reduktion und Carboxyamidomethylierung war klar geworden, dass es sich bei den durch die Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennten Komplexen um Oligomere von relativ kleinen Peptiden handelte, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten wurden. Die nächste Frage war nun, wie stark diese Oligomere miteinander vernetzt waren und wie gross das Verhältnis zwischen den Thiolat-Liganden und Cd war. Diese Fragen wurden mittels fraktioneller Modifikation der Cysteine untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Thiolat-Gruppen unter denaturierenden Bedingungen mit Jodacetamid alkylirt. Im zweiten Schritt wurde mit DTE reduziert und mit Vinylpyridin modifiziert. In dem erhaltenen Produkt waren die Thiolat-Gruppen des nativen Proteins carboxyamidomethyliert und die Cysteine, die an der Bildung der Disulfidbrücken teilnahmen, pyridyläthylirt.



Figur 12.V: Auftrennung der pyridyläthylierten Peptide von Phytochelatin. Die vier bezeichneten Peptide enthalten zusammen mehr als 90 % des in der aufgetragenen Probe vorhandenen Cys. Weitere Peptide sind in kleinen Mengen vorhanden. Erstaunlich ist, dass Komplex I und Komplex II beinahe dasselbe Peptidmuster zeigen, also aus den gleichen Peptiden aufgebaut werden.

Puffersystem: Puffer A 0.1 % TFA; Puffer B 0.1 % TFA/60 % Acetonitril, Flussgeschwindigkeit 1 ml/min, Säule: RP 18, 10 μ m, (Brownlee)

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 12.IV aufgeführt. Dabei fällt auf, dass in Komplex I etwa 30 % und in Komplex II etwa 60 % der Cysteine in der Form von Disulfid-Brücken vorliegen. In beiden Komplexen ist jedoch das Thiolat/Cd-Verhältnis beinahe 2, was darauf hinweist, dass in beiden Komplexen Cd(II) in derselben Art und Weise gebunden ist.

12.4 Fraktionierung der pyridyläthylierten Peptide

Die Pyridyläthyl-Derivate der durch Reduktion mit DTE erhaltenen Peptide von Phytochelatrin lassen sich mittels 'reverse phase' HPLC gut auftrennen (Figur 12.V). Mit einem Puffersystem von 0.1 % TFA (Puffer A) und 0.1 % TFA/60% Acetonitril (Puffer B) eluieren die Peptide zwischen 30 und 50 % Puffer B in Puffer A (Figur 12.V).

Tabelle 12.VI: Aminosäurezusammensetzung der rechromatographierten Peptide 1 bis 4 (vergl. 11.9). Das N-terminale Glu bzw. Gln wurde bei der Pyridyläthylierung modifiziert und erscheint deshalb nicht in der Aminosäureanalyse.

Phytochelatrin	Glu ^{b)}	Cys	Gly ^{a)}	min. M_r ^{c)}
Peptid 1	8	6	1	1850
Peptid 2	10	9	1	2450
Peptid 3	8 ^{d)}	7	-	1900
Peptid 4	8	8	1	2060

a) normiert auf ein Gly

b) ohne N-terminales Glu

c) mit N-terminalem Glu

d) normiert auf 7 Cystein

Bei der Chromatographie der reduzierten und pyridyläthylierten Komplexe I und II zeigt sich, dass diese hauptsächlich aus den vier gleichen Peptiden aufgebaut sind, wobei das Verhältnis der Peptide zwischen den beiden Cd-bindenden Komplexen nur leicht variiert. Die bei der Chromatographie vor Peptid 1 (Peak 1) auftretenden Peaks enthalten keine Aminosäuren, und über 90 % des aufgetragenen Cysteins erscheint mit den vier hauptsächlichen Peaks. Bei den nach Peptid 4 erscheinenden Schultern handelt es sich ebenfalls um Peptide, die hauptsächlich aus Glutaminsäure und Cystein zusammengesetzt sind, deren Mengen jedoch für eine weitere Charakterisierung zu gering waren.

Wie die in Tabelle 12.VI dargestellten Aminosäurezusammensetzungen zeigen, ist Phytochelatin aus Mais aus grösseren Peptiden aufgebaut als die etwas besser charakterisierten Formen aus Dikotyledonen, deren Länge 15 Aminosäuren nicht übersteigt (Grill et al., 1985). Das Auftreten eines Peptides, das kein Gly enthält, erklärt auch die, verglichen mit Glycin, zu grosse Menge an Glutaminsäure, die bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure erhalten wurde. Des weiteren stimmen die minimalen Molekulargewichte der erhaltenen Peptide gut mit denjenigen überein, die man auf Grund der Gelfiltration über Sephadex G-25 erwarten würde. Allerdings lässt sich aus den Daten nicht auf die Zusammensetzung der einzelnen Komplexe schliessen.

13. DISKUSSION

13.1 Reindarstellung von nativem Phytochelatin

Die nach Gelfiltration gesammelten Fraktionen enthalten, wie aus der Aminosäurezusammensetzung hervorgeht, nur noch Phytochelatin. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, das native Protein aus Pflanzen ohne Verunreinigung durch bräunliche Polyphenole zu isolieren. Anstrengungen, die Entstehung dieser braunen Substanzen durch die Zugabe von Thioharnstoff und KCN,

zur Hemmung der Polyphenoloxidasen (Van Driessche et al., 1984), zu vermeiden, haben zu einer starken Verminderung der Bildung dieser Farbstoffe ($\approx 100 \times$) geführt.

Versuche, diese Kontaminanten durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zu entfernen, zeigten nur geringe Wirkung oder veränderten den zu reinigenden Komplex. Auch Versuche mit Polyethylenglykol und Octylsepharose führten nicht zum Erfolg, da beide weder mit Phytochelatin noch mit den gebundenen Polyphenolen interagieren. Anstrengungen, die nativen Phytochelatine mittels 'reverse phase' HPLC zu reinigen, blieben erfolglos (W. Rauser, nicht publizierte Daten), da wegen der extrem niedrigen Hydrophobizität diese Peptide kaum mit der stationären Phase interagierten. Mit dieser Methode war es zwar möglich, einen Teil der braunen Farbe zu entfernen, wobei aber immer ein Rest an Polyphenolen zurückblieb. Die einzige Möglichkeit, Phytochelatin ohne Verunreinigung durch solche Substanzen zu erhalten, dürfte seine Gewinnung aus pflanzlichen Zellkulturen sein (Grill et al., 1985).

13.2 Cd-Bindungseigenschaften und Koordination

Aus den UV- und CD-Spektren der bereits isolierten Phytochelatine geht deutlich hervor, dass Cd(II) durch Thiolat-Liganden gebunden wird (Rauser & Glover, 1984; Grill et al., 1985). In allen publizierten Spektren von Phytochelatin liegt der Ligand $\rightarrow$ Metall Charge-Transfer Übergang mit der niedrigsten Energie bei 270 nm, d.h. er ist gegenüber Cd-MT um 10 - 20 nm ins Rote verschoben. Andererseits ist auf Grund des bekannten Thiolat/Cd-Verhältnisses von 2 für Phytochelatin aus Mais wie aus *Rauwolfia serpentina* (Grill et al., 1985) zu erwarten, dass bei tetraedraler Koordination der Cd-Ionen praktisch nur Brückenliganden auftreten. Da diese aber bei niedrigeren Energien absorbieren (verl. 5.2; Willner, 1986) als die terminalen Liganden, wäre damit zumindest ein Teil der Rotverschiebung des langwelligsten Übergangs erklärt. Andererseits ist es aber auch möglich, dass die spektrale Verschiebung durch eine etwas andere Anordnung der Cysteine in den Komplexen bewirkt wird. Auf jeden Fall besitzt Phytochelatin eine inerte Struktur als Cd-Metallothionein, was aus Modifikationsexpe-

rimenten mit DTNB hervorgeht, wo selbst in 6 M Guanidin-HCl/40 mM EDTA die Reaktion nur sehr langsam abläuft, was auf eine grössere Stabilität der Cd-Komplexe hinzudeuten scheint.

13.3 Das Problem der Disulfidbrücken

Während der Extraktion und Ionentauscherchromatographie von Phytochelatin wurde versucht, möglichst O_2 -frei zu arbeiten. Dies ist aber bei so komplizierten Arbeitsvorgängen nur beschränkt möglich, so dass zur Aufrechterhaltung von leicht reduzierenden Bedingungen Ascorbinsäure und β -Mercaptoäthanol zugegeben werden müssen. Die Aufgabe dieser beiden Reduktionsmittel ist eine doppelte, indem sie als O_2 -Fänger zu wirken haben und andererseits einen Redox-Puffer bilden, der die Polyphenole im reduzierten Zustand erhält, so dass sich diese ihrerseits nicht an der Oxidation der Thiolat-Gruppen beteiligen.

So weit man das heute beurteilen kann, ist auf Grund der hohen Ausbeuten an Cd und der fehlenden Verluste von Cd während der Reindarstellung anzunehmen, dass fast alle Thiolat-Liganden erhalten bleiben. Ein weiterer Hinweis dafür ist, dass der grössere Cd-bindende Komplex (I) weniger Disulfid-Gruppen aufweist als der kleinere (II). Hätte die Oxidation zu Cystin während der Präparation stattgefunden, so müsste diese zufällig eingetreten sein und hätte damit entsprechend dem Ausmass der Disulfid-Brückenbildung zu vermehrter Polymerisation geführt. Da dies offensichtlich nicht der Fall ist, darf man annehmen, dass während der Präparation nur wenige oder keine Disulfide gebildet werden.

Der Nachweis, dass Disulfidbrücken bereits im nativen Phytochelatin vorhanden sind, ist jedoch äusserst schwierig. Dazu müsste man zeigen, dass während der Präparation keine Oxidationen stattgefunden haben. Wenn man aber bedenkt, dass in den Wurzeln immer Luft und andere Oxidationsmittel (Phenole) vorhanden sind, erscheint dies beinahe unmöglich, so dass aus diesen Gründen die Extraktion in Gegenwart von β -Mercaptoäthanol durchgeführt werden muss. Unter diesen Bedingungen wird jedoch auch die Reduktion von bestehenden Disulfid-Brücken und der Austausch von Disulfiden begünstigt.

Interessant ist, dass Grill et al. (1985) bei ihren Präparationen ebenfalls ein Thiolat/Cd-Verhältnis von 2 erhielten, aber keine Disulfidbrücken fanden. Ein weiterer Vergleich mit anderen Präparationen von Phytochelatin ist nicht möglich, weil in keinem Fall ein Cys/Cd-Verhältnis angegeben wurde, oder weil während der Präparation unter stark reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde. Zudem fehlen in allen Publikationen Angaben über die Cd-Ausbeuten der Präparation. Immerhin kann aber die vergleichbare Thiolat/Cd-Stöchiometrie bei Grill et al. (1985) als Bestätigung der obigen Interpretationen betrachtet werden.

13.4 Molekulargewicht der Cd-bindenden Komplexe

Aussagen über das Molekulargewicht der Phytochelatine in Maiswurzeln sind schwierig, da wahrscheinlich in jeder der beiden durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen mehrere Komplexe vorliegen. Weiter ist nicht untersucht worden, ob das apparente Molekulargewicht dieser Komplexe von der Ionenstärke abhängig ist, wie dies für die Phytochelatine aus Kohl und *Rauwolfia serpentina* nachgewiesen wurde (Wagner, 1984; Grill et al., 1985). Trotzdem darf man aber auf Grund des unterschiedlichen Vernetzungsgrades von Mais-Phytochelatin annehmen, dass in Maiswurzeln zumindest zwei Gruppen von Phytochelatinen vorkommen. Dies scheint jedoch keine Besonderheit des Mais zu sein, sind doch auch in Hefe (Murasugi et al., 1984) und *Datura innoxia* (Jackson et al., 1984) zwei verschiedene Cd-bindende Komplexe mit vergleichbaren apparenten Molekulargewichten nachgewiesen worden.

Alle bis heute bekannten Phytochelatine scheinen auf Grund ihres Molekulargewichtes aus kleineren Peptiden aufgebaut zu sein (Grill et al., 1985). In den aus Dikotyledonen isolierten Formen wurden keine Disulfidbrücken gefunden, was bedeuten könnte, dass in diesen Formen die einzelnen Peptide durch Koordinationsbrücken zusammengehalten werden. Eine Cd-Brücke wäre allerdings kaum sehr stabil, da anzunehmen ist, dass auf Grund der Labilität der Cd-Thiolat-Bindung solche Komplexe dauernden Umlagerungen unterworfen wären. Andererseits wäre eine mögliche Erklärung für die starke Ionenstärke-Abhängigkeit der apparenten Molekulargewichte der aus Dikotyledonen isolierten Phytochelatine darin zu finden, dass deren Oligomerisierungsgrad von der Ionenstärke bestimmt werden könnte.

13.5 Evidenz für γ -Glutamyl-Bindungen

Angesichts der Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung der Peptide von Phytochelatin aus Maiswurzeln mit denjenigen anderer bereits sequenzierter Formen (Grill et al., 1985; Robinson et al., 1985) war zu vermuten, dass auch diese Peptide γ -Glutamyl-Bindungen enthalten. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden an den pyridyläthylierten Peptiden Verdauungsexperimente mit V_8 -Protease, α -Chymotrypsin und Carboxypeptidase angestellt. Trotz extremer Bedingungen (hohe Enzymkonzentration) fand in allen Fällen keine Reaktion statt. Dies darf als Hinweis für das Vorhandensein von γ -Glutamyl-Bindungen gewertet werden, da kaum zu erwarten ist, dass z.B. für die V_8 -Protease überhaupt keine Spaltstelle vorhanden ist. Endgültige Klarheit darüber wird jedoch nur die Bestimmung der Sequenz ergeben.

13.6 Weitere Arbeiten, Probleme

Der Beweis für das Vorhandensein von Disulfidbrücken im nativen Mais-Phytochelatin und die Identifizierung ihrer Lage dürfte schwierig sein, da um letzteres zu erreichen, jeglicher Disulfidaustausch ausgeschlossen werden muss. Ein realistisches Modell der nativen Struktur dieses Proteins kann aber nur auf Grund solcher Kenntnisse abgeleitet werden.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, empfindlichere Methoden zur Quantifizierung von Phytochelatin zu entwickeln, mit deren Hilfe die physiologischen Funktionen untersucht werden können. Einfache Nachweismethoden werden auch für die Identifikation der Enzyme notwendig sein, die die Herstellung dieser atypischen Peptide katalysieren und die vermutlich durch Metalle induziert werden.

Weitere Probleme ergeben sich durch die Vielfalt der bis heute identifizierten Phytochelatine. So gibt es für verschiedene Präparate aus Mais wohldokumentierte Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung (Rauser and Glover, 1984; diese Arbeit). Es stellt sich deshalb auch die Frage, inwieweit eventuell Induktionsbedingungen und Maissorte die Form dieser Phytochelatine bestimmt. In diesem Zusammenhang wäre auch abzuklären, ob

Phytochelatin aus Zellkulturen identisch ist mit jenem, das aus der entsprechenden Pflanze isoliert wird.

14. ANHANG

14.1 Literaturverzeichnis

- Bernhard, W.R. (1982) Diplomarbeit, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Bethune, J.L., Budreau, A.J., Kägi, J.H.R. & Vallee, B.L. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 207, Birkhäuser Verlag, Basel
- Blum, P. (1986) Diplomarbeit, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Bosshard, H.R. (1979) Meth. of Biochem. Anal. (Ed. Glick, D.) Band 25, S. 273ff, Wiley & Sons Inc., New York
- Bradford, M.,M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248
- Bühler, R.H.O. (1974) Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Bühler, R.H.O. & Kägi, J.H.R. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 211, Birkhäuser Verlag, Basel
- Bürgi, H.B. (1974) Helv. Chim. Acta 57, 514
- Cantor, R.C. & Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry, Freeman and Company, San Francisco
- Carson, G.K., Dean P.A.W. and Stillman, M.J. (1981) Inorg. Chim. Acta 56, 59
- Carson, G.K. & Dean P.A.W. (1982) Inorg. Chim. Acta 66, 157
- Cotton, F.A. & Wilkinson G. (1974) Anorganische Chemie, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim
- Cox, R.P., & Ruckenstein, A. (1971) J. Cell. Physiol. 77, 71
- Cousins, R.J. (1986) Physiol. Rev., im Druck
- Dance, I.G. (1980) J. Am. Chem. Soc. 102, 3445
- DeJong, C., Hughes, G.J., van Wieringen, E., & Wilson, K.J. (1982) J. Chromatogr. 241, 345
- Durnam, D.M. & Palmiter, R.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5712

- Glazer, A.N., Delange, R.J. & Sigman, D.S. (1975) in Chemical Modification of Proteins, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Amsterdam
- Failla, M.L. & Cousins, R.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 113, 267
- Frey, M.H., Wagner, G., Vasak, M., Sörensen, O.W., Neuhaus, D., Ernst, R.R., Wörgötter, E., Kägi, J.H.R. & Wüthrich, K. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6847
- Furey, W.F., Robbins, A.H., Clany, L.L., Winge, D.R., Wang, B.C. & Stout, C.D., (1986) *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck
- Garvey, J.S., (1984) *Environ. Health Perspect.* 54, 117
- Gilg, D.E.O. (1985) Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Good, M. (1986) Dissertation in Vorbereitung, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Grill, E., Winnaker, E.-L. & Zenk, M.H. (1985) *Science* 230, 674
- Hamer, D. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, im Druck
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., (1938) *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* No 347
- Hogan, G.D. & Rauser, W.E. (1981) *J. Exp. Bot.* 32, 27
- Holt, D., Magos, L. & Webb, M. (1980) *Chem.-Biol. Interact.* 32, 125
- Hunziker, P.E. & Kägi, J.H.R. (1985) *Biochem. J.* 231, 375
- Jackson, P.J., Roth, E.J., McClure, P.R. & Naranjo, C.M. (1984) *Plant Physiol.* 75, 914
- Jörgensen, C.K. (1967) *Halogen Chemistry 1* (Ed. Gutmann, V.) S. 265ff, Academic Press, London.
- Jörgensen, C.K. (1970) *Prog. Inorg. Chem.* 12, 101
- Kägi, J.H.R. & Vallee, B.L. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3460
- Kägi, J.H.R. & Vallee, B.L. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2435
- Kägi, J.H.R., Himmelhoach, S.R., Whanger, P.D., Bethune, J.L. & Vallee, B.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3537
- Kägi, J.H.R. & Kojima, Y. (1979) in *Metallothionein* S. 141f (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.) Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kägi, J.H.R. & Hapke, H.-J. (1984) in *Changing Metal Cycles and Human Health*, S. 237ff (Ed. Nriagu, J.O., Dahlem Konferenzen 1984, Springer Verlag, Heidelberg.

- Kimura, M., Otaki, N. & Imano, M. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 163ff, Birkhäuserverlag, Basel
- Kissling, M.M. (1979) Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Kissling, M.M. & Kägi, J.H.R. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 221ff, Birkhäuser Verlag, Basel
- Klauser, K., Kägi, J.H.R. & Wilson, K.J. (1983) *Biochem. J.* 209, 71
- Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B.L. & Kägi, J.H.R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3413
- Kojima, Y. & Kägi, J.H.R. (1978) *Trends Biochem. Sci.* 3, 90
- Lerch, K. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 173ff, Birkhäuser Verlag, Basel
- Margoshes, M. & Vallee, B.L. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813
- McMillin, D.R. (1978) *Bioinorg. Chem.* 8, 179
- Müller, W.-U., Steffer, Ch. & Kaiser, U. (1982) *Arch. Toxicol.* 51, 303
- Münger, K., Germann, U.A., Beltramini, M., Niedermann, D., Baitella-Eberle, G., Kägi, J.H.R. & Lerch, K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10032
- Murasugi, A., Wada, C. & Hayashi, Y. (1981) *J. Biochem.* 90, 1561
- Murasugi, A., Wada, C. & Hayashi, Y. (1983) *J. Biochem.* 93, 661
- Murasugi, A., Wada, C. & Hayashi, Y. (1984) *J. Biochem.* 96, 1375
- Nettesheim, D.G., Engeseth, H.R. & Otvos D.J. (1985) *Biochemistry* 24, 6744
- Neville, T. & Drakenberg, T. (1974) *Can. J. Chem.* 52, 616
- Nielson, K.B. & Winge, D.R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13063
- Nicholson, J.K., Sadler, P.J., Vasak, M. (1985) in Metallothionein, Proceedings of the "Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins", Zürich, 1985, (Eds. Kägi, J.H.R. and Kojima, Y.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1986
- Olafson, R.W., Sim, R.G. & Kearns, A. (1979) in Metallothionein (Eds. Kägi, J.H.R. & Nordberg, M.), S. 197ff, Birkhäuser Verlag, Basel
- Liebermann, M.W., Beach, L.R. & Palmiter, R.D. (1983) *Cell* 35, 207
- Pande, J., Vasak, M. & Kägi, J.H.R. (1985) *Biochemistry* 24, 6717
- Poulik, M.D. (1957) *Nature* 180, 1477
- Rausser, W.E. & Glover, J. (1984) *Can. J. Bot.* 62, 1645
- Richards, M.P. & Cousins, R.J. (1975) *Bioinorg. Chem.* 4, 215

- Robinson, N.J., Barton, K., Naranjo C.M., Sillerud, L.O., Trewella, J., Watt, K. & Jackson, P.J. (1985) in *Metallothionein, Proceedings of the "Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins"*, Zürich, 1985, (Eds. Kägi, J.H.R. and Kojima, Y.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1986
- Schatz, P.N. & McCaffery, A.J. (1969) *Q. Rev. Chem. Soc. London* 23, 552
- Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.M., Norstedt, G. & Palmiter, R.D. (1984) *Mol. Cell Biol.* 4, 1221
- Sokolowsky, G., Pilz, W. & Weser, U. (1974) *FEBS Lett.* 48, 222
- Swenson, D., Bänziger, N.C. & Coucouvanis, D. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 100, 1933
- Szymanska, J.A. & Stillman, M.J. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108, 919
- Szymanska, J.A., Law, A.Y.C., Zelazowsky, A.J. & Stillman, M.J. (1983) *Inorg. Chim. Acta* 79, 123
- Takeshima, S. & Sakurai, H. (1982) *Inorg. Chim. Acta* 66, 119
- Taylor, N.J. & Carty, A.J. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6143
- Thornalley, P.J. & Vasak, M. (1985) *Biophys. Biochim. Acta* 827, 36
- Vallee, B.L. & Ulmer, D.D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91
- VanDriessche, E. Beekmans, S., Dejaegere, & Kanarek, L. (1984) *Anal. Biochem.* 141, 184
- Vasak, M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 3953
- Vasak, M., Holmquist, B., Vallee, B.L. & Kägi, J.H.R. (1981) *Biochemistry* 20, 6659
- Vasak, M. & Kägi, J.H.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6709
- Vasak, M. & Kägi, J.H.R. (1983) in *"Metal Ions in Biological Systems"* (Ed. Sigel, H.) Band 15, SS. 213 – 273, Marcel Dekker, New York
- Vasak, M., Berger C. & Kägi, J.H.R. (1984) *FEBS-Letters* 1303, 174
- Wagner, G.J. & Trotter M.M. (1982) *Plant Physiol.* 69, 804
- Wagner, G.J. (1984) *Plant. Physiol.* 76, 797
- Webb, M. & Magos, L. (1976) *Chem.-Biol. Interact.* 14, 357
- Whanger, P.D., & Deagen, J.T. (1983) *Environ. Res.* 30, 372
- Willner, H., Vasak, M. & Kägi, J.H.R. (1983) *Inorg. Chim. Acta* 79, 106
- Willner, H. (1986) Dissertation in Vorbereitung, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich
- Zelazowski, A.J. & Piotrowski, J.K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 625, 89

14.2 Abkürzungen

CD	Circulardichroismus
Chelex	Polystyrolharz mit $-\text{CNH}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ - Gruppen
CT-Übergang	Charge-Transfer Übergang
Dns-	Dansyl- (Aminosäure)
DTE	Dithioerytritol
DTNB	Dithio-bis-4,4' Nitrobenzoesäure
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
K_D	Verteilungskoeffizient der Gelfiltration
K_d	Dissoziationskonstante
LMCT-Übergang	Ligand $\rightarrow$ Metall Charge-Transfer Übergang
MCD	magnetischer Zirkulardichroismus
Me	Metall
MO	Molekülorbital
MT	Metallothionein
Apo-MT	Apo-Metallothionein
$\text{Me}_n\text{-MT}$	Metallotionein mit n gebundenen Metallionen
M_r	Molekulargewicht
E-KMT-1B	Equine Kidney Metallothionein Isoform 1B
R-LMT-1 (2)	Rabbit Liver Metallothionein Isoform 1 resp. 2
H-LMT-2 (1)	Human Liver Metallothionein Isoform 1 resp. 2
PC	Phytochelatin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	UV-Absorption
$\Delta_i\text{UV}$	UV Inkrement-Differenz-Absorption
ε	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
$\Delta\varepsilon$	Differenz-Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
χ_{opt}	optische Elektronegativität
ν	Wellenzahl [m^{-1}]
$[\Theta]$	molare Elliptizität [$\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$]
$[\Theta]_M$	molare magnetische Elliptizität [$\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}\text{Gauss}^{-1}$]

Aminosäurereste (IUPAC-IUB 1966, 1969)

Ala	A	Alanin
Asp	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
Ile	I	Isoleucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Val	V	Valin

Derivate von Cysteinresten:

CySO ₃	Cysteinsäure
CM-Cys	Carboxymethyl-cystein
CAM-Cys	Carboxyamidomethyl-cystein
PE-Cys	Pyridyläthyl-cystein

14.3 Verzeichnis der Tabellen und Figuren

	Seite	
Tabelle 2.I	19	Vergleich von chemischen Eigenschaften von Zn(II)-, Cd(II)- und Hg(II)-Ionen
Tabelle 3.I	22	Bestimmung von Hg(II) in Metallothionein haltigen Lösungen
Tabelle 4.I	31	Eigenschaften von Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.II	32	Optische Spektroskopie von Hg ₁ - bis Hg ₇ - Metallothionein
Figur 4.III	34	Optische Spektroskopie von Hg ₇ - bis Hg ₁₂ - Metallothionein
Figur 4.IV	36	Abhängigkeit der Amplituden der optischen Spektren von Hg-Metallothionein vom Hg-Gehalt
Figur 4.V	38	Optische Spektroskopie von (Hg,Zn) ₇ - Metallothionein
Figur 4.VI:	40	Modifizierbarkeit von Cys in Metallothionein mit DTNB in Abhängigkeit vom Hg-Gehalt
Figur 4.VII:	42	Kinetik der Modifikation von Apo-, Zn ₇ -, Cd ₇ - und Hg ₇ -Metallothionein mit DTNB
Figur 4.VIII:	43	Ladung von Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.IX	44	Ionenstärkeabhängigkeit des Stokes' Radius von Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.X:	45	Gelfiltration von Hg ₇ -Metallothionein und nativem R-LMT-1 sowie Bestimmung des Stokes' Radius
Tabelle 4.XI:	45	Stokes' Radien von Hg ₇ - und Hg ₁₀ -Metallothionein sowie den Referenzproteinen
Figur 4.XII	47	Differentielle Modifikation von Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.XIII	48	pH-Abhängigkeit der UV-, CD- und MCD-Spektren von Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.XIV	50	pH-Abhängigkeit der Amplituden von UV-, CD- und MCD-Spektrum von Hg ₇ -Metallothionein
Tabelle 4.XV	53	Apparente pK _a -Werte von Carboxyl- und Amino-gruppen sowie der protonierbaren Hg-Thiolat-Bindungen in Hg ₇ -Metallothionein
Figur 4.XVI	52	Potentiometrische Titration von Hg ₇ -Metallothionein

Figur 5.I	60	MCD-Differenz-Spektren von Hg_7 - und Hg_3 -Metallothionein sowie von $(\text{Hg}_1, \text{Zn}_6)$ - und Hg_1 -Metallothionein
Figur 7.I:	76	Fraktionierung der tryptischen Peptide von carboxyamidomethyliertem Metallothionein
Figur 8.I:	79	Kinetik der Reaktion von Cd-Metallothionein mit Jodacetamid und DTNB
Tabelle 8.II:	80	Verzeichnis der tryptischen Peptide von Kaninchen Leber Metallothionein-2
Figur 8.III:	81	Differentielle Modifikation von Apo-, Cd_1 - bis Cd_7 -Metallothionein
Figur 8.IV:	83	Absolute Reaktivitäten von Cd_6 - und Cd_7 -Metallothionein bei differentieller Modifikation
Figur 8.V:	84	Differentielle Modifikation von Cd_7 -Metallothionein nach Behandlung mit EDTA
Figur 11.I:	92	Versuchsanordnung bei Keimung und Wachstum von Mais sowie der Induktion von Phytochelatin
Tabelle 11.II:	93	Zusammensetzung der Medien für Wachstum und Induktion von Phytochelatin in Mais
Tabelle 11.III:	94	Zusammensetzung der für die Präparation von Phytochelatin benötigten Puffer
Figur 12.I:	98	Ionentauscherchromatographie des Phytochelatin-Extraktes
Figur 12.II:	99	Auftrennung der beiden Cd-bindenden Phytochelatine aus Mais-Wurzeln
Tabelle 12.III:	100	Aminosäurezusammensetzung der beiden Cd-bindenden Phytochelatine aus Mais-Wurzeln
Tabelle 12.IV:	102	Gehalt an Cystein und Cystin sowie Thiolat/Cd-Verhältnis in den beiden Cd-bindenden Komplexen von Mais-Phytochelatin
Figur 12.V:	103	Fraktionierung der pyridyläthylierten Peptide von Mais-Phytochelatin mit 'reverse phase' HPLC
Tabelle 12.VI:	104	Aminosäurezusammensetzung der pyridyläthylierten Peptide von Mais-Phytochelatin

14.4 Lebenslauf

Werner Robert Bernhard, geboren am 15. 6. 1953 in St. Gallen, Bürger von Winterthur, verheiratet.

Ausbildung und Berufstätigkeit

1960 – 1966	Primarschule Amriswil (TG)
1966 – 1969	Sekundarschule Amriswil
1969 – 1972	Lehrerseminar Kreuzlingen (TG)
1972 – 1973	Lehrer in Salmsach (TG)
1973 – 1974	Lehrerseminar Kreuzlingen
1974	Patent als Primarlehrer, Kanton Thurgau
1974 – 1976	Lehrer in Frauenfeld
1976 – 1977	Mathematikstudium mit 1. Vordiplom an der Universität Zürich
1977 – 1982	Biochemiestudium an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich mit einer Diplomarbeit bei Prof. Dr. J.H.R. Kägi am Biochemischen Institut
1982	Diplom der Philosophischen Fakultät II als Naturwissenschaftler mit Hauptfach Biochemie
1982 – 1986	Dissertation bei Prof. Dr. J.H.R. Kägi, Assistent am Biochemischen Institut der Uni Zürich

Besuch von Vorlesungen, Uebungen und Kurse folgender Dozenten:

Ammeter, Bachofen, Baumann, Birnstiel, Billeter, Bosshard, Brun, Christen, Dreiding, Dübendorfer, Engfer, Eugster, Fischer, Gehring, Gross, Gutte, Hanselmann, Hediger, Hesse, Huber, Humbel, Jarchow, Jaussi, Jungen, Kägi, Kündig, Lerch, Meyer, Oswald, v.Philipsborn, Rohweder, Salzer, Steiner, Strebel, Vepřek, Wagnière, Weber, Wilson.

